

FISIOLOGIA DA REPRODUÇÃO DOS MEXILHÕES (*MYTILUS PERNA* — MOLLUSCA LAMELLIBRANCHIA)

João Edmundo Lunetta

(Departamento de Fisiologia Geral e Animal da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da Universidade de São Paulo e Instituto de Biologia Marinha da Universidade de São Paulo. Caixa Postal 11.230, São Paulo, Brasil).

36 Figs.

Í N D I C E

| | |
|--|-----|
| 1. Introdução | 36 |
| 2. O material e sua procedência | 39 |
| 3. Citologia e citoquímica das gônadas durante a gametogênese | 41 |
| a) Espermatogênese | 42 |
| b) Oogênese | 43 |
| 4. Lise oocitária | 50 |
| 5. O ciclo sexual e suas modalidades | 55 |
| 6. Análise da frequência dos diferentes estádios .. | 65 |
| 7. Comparação entre a duração do ciclo sexual de <i>M. perna</i> e dos ciclos de outras <i>Mytilidae</i> | 78 |
| 8. O tecido conjuntivo interfolicular | 82 |
| a. Introdução | 82 |
| b. origem do tecido conjuntivo | 84 |
| c. evolução do tecido conjuntivo | 88 |
| d. ciclo do glicogênio | 95 |
| e. ciclo dos lipídeos | 96 |
| 9. Discussão | 100 |
| 10. Conclusão | 107 |
| 11. Bibliografia | 109 |

RESUMO: Estudou-se a histofisiologia dos órgãos da reprodução do mexilhão, *Mytilus perna*, comparando-se o ciclo sexual com o de outras *Mytilidae*, *M. edulis*, *M. galloprovincialis* e *M. californianus*. Investigou-se também a relação entre o ciclo sexual e o tecido conjuntivo que se desenvolve dentro e entre os folículos após a emissão dos gametas e que contém importantes reservas de glicogênio e de lipídeos. O ciclo sexual de *M. perna* é praticamente contínuo, havendo períodos de reprodução mais acentua-

dos no outono e na primavera, e menos no verão e no inverno. Notou-se no mês de março intensa lise dos oócitos que se pode perceber precocemente pela vacuolização da periferia do citoplasma.

CONCLUSÕES:

1. A gametogênese de **M. perna** apresenta os mesmos fenômenos conhecidos em geral em outras Mytilidae.
2. Há uma quantidade apreciável de RNA nos oócitos em vitelogênese mesmo sem prévia decerebração.
3. Em **M. perna** os mucopolisacarídeos ácidos desaparecem no fim da vitelogênese o que não ocorre em outras Mytilidae.
4. Há um fenômeno de lise dos oócitos bastante evidente.
5. Esta lise independe da diminuição da temperatura.
6. A vacuolização na periferia do citoplasma é índice da lise dos ovócitos.
7. Em **M. perna** existe uma estreita relação entre células sanguíneas e certos estádios do ciclo sexual.
8. Os períodos de eliminação dos gametas são principalmente abril, maio, início de junho e também em setembro.
9. A emissão de gametas em **M. perna** é contínua durante o ano, porém, diminui acentuadamente em julho e dezembro.
10. Demonstrou-se existir uma estreita relação entre o desenvolvimento do tecido conjuntivo interfolicular e o ciclo sexual.
11. O acúmulo de glicogênio e lipídeos no tecido conjuntivo é sincrônico com o aparecimento deste tecido.
12. Propõe-se uma nova nomenclatura para designar as diferentes fases de proliferação e diminuição do tecido conjuntivo interfolicular.

*

PHYSIOLOGY OF REPRODUCTION OF MUSSELS (**MYTILUS** **PERNA** — MOLLUSC LAMELLIBRANCH).

ABSTRACT: Histophysiology of reproductive organs of *Mytilus perna*, the most common mussel of Brazilian

coast, has been studied in relation to the sexual cycle of other Mytilidae (*Mytilus edulis*, *M. galloprovincialis* and *M. californianus*). The relationship between the sexual cycle and the connective tissue which develops within and between the follicles after expulsion of gametes was also investigated. This tissue contains important reservation of glycogen and lipids.

Sexual cycle of *M. perna* is practically continuous. There are periods of reproduction more intensive on autumn and spring and lower on summer and winter.

CONCLUSIONS:

1. No difference has been detected on the gametogenesis of *M. perna* which show the same aspect of that of other Mytilidae.

2. A quantity of RNA in the oocytes during vitellogenesis, even without decerebration has been detected.

3. Acid mucopolysaccharides disappear at the end of the vitellogenesis in *M. perna*. This phenomena does not occurs on other Mytilidae.

4. The lysis of the oocytes is very evident, and does not depend on the lowering of temperature.

5. Vacuolization at the periphery of the cytoplasm indicates the beginning of the lysis.

6. There is closed relation between the blood cells and some states of the sexual cycle.

7. Expulsion of the gametes occurs chiefly on April, May and on the beginning of June and September.

8. There is an closed relation between the development of the interfollicular connective tissue and the sexual cycle.

9. Accumulation of glycogen and lipids in the connective tissue is synchronic with the appearance of this tissue.

10. A new nomenclature to nominate the different phases of proliferation and decreasing of the connective tissue is proposed.

INTRODUÇÃO

A exploração dos recursos do mar atrai hoje a atenção de muitos pesquisadores, principalmente nos países em que se impõe cada vez mais a procura de novas fontes de alimentação. Dentre estas, os mexilhões constituem uma das mais promissoras, dada a sua extensa distribuição e principalmente apreciável densidade em suas reservas naturais.

A utilização dos mexilhões que em geral pertencem à família Mytilidae, como fonte de alimentação depende, naturalmente, do conhecimento de sua biologia, mas não obstante a soma de dados já conhecidos sobre estes moluscos, muito escassos são ainda os que se referem aos das regiões tropicais, especialmente do litoral brasileiro.

Entre nós, Tobias e Silva (1955, p. 80) interessou-se pelos mexilhões que ocorrem nas lagunas do Estado de Alagoas, onde as reservas naturais são exploradas para alimentação da população litorânea; Maltz e Faerman (1958, p. 3) enumeram os moluscos comestíveis do sul do país e De Jorge (1961, p. 141) fez a análise química de várias substâncias alimentícias entre as quais inclui o *Mytilus perna*.

Em 1955 o Centro de Cooperação Científica para a América Latina de Montivideo mantido pela UNESCO promoveu em Viña del Mar (Chile), uma reunião dos diretores dos laboratórios costeiros da América Latina, na qual se aprovou o chamado «PROGRAMA MYTILUS», destinado ao estudo da biologia das Mytilidae, Lamelibrânquios muito frequentes tanto no litoral Pacífico com no Atlântico das Américas.

O Departamento de Fisiologia Geral e Animal e o Instituto de Biologia Marinha da Universidade de São Paulo empenham-se em dar cumprimento ao referido «Programa

Mytilus» e para isso constituíram um grupo de pesquisadores interessados na biologia dêsses animais.

Por sugestão do Prof. Dr. Paulo Sawaya, coube-me investigar alguns dos mais importantes aspectos do ciclo sexual de *M. perna*. Como facilmente se compreende, êste é um ponto de vital importância na pesquisa sôbre a biologia dêstes Lamelibrânquios, pois, sem informações sôbre o ritmo, a frequência e a progressão do ciclo da reprodução, outros aspectos biológicos serão difilcimente abordáveis. Trata-se, pois, de uma investigação fundamental para que se possa, na realidade, bem desenvolver o referido «Programa».

Muito pouco se sabe da biologia da reprodução dos mexilhões das regiões tropiciais, embora sejam numerosas as informações relativas ao ciclo sexual dêstes moluscos no hemisfério Norte, principalmente no Mediterrâneo, no Atlântico, no mar do Norte e no Pacífico onde vêm sendo estudados principalmente o *Mytilus edulis*, o *M. galloprovincialis* e o *M. californianus* (White 1937, p. 89). Estas informações, porém, não correspondem ao que se observa no litoral brasileiro com o *M. perna*, região que se caracteriza por uma temperatura relativamente elevada durante o ano, com ausência de inverno rigoroso.

Mesmo no Mediterrâneo, região bem pesquisada, como a do Golfo de Nápoles, os dados referentes ao desenvolvimento do ciclo sexual ainda são relativamente precários. Os trabalhos de Renzoni (1961, p. 47), entre outros dão conta da variação do ciclo sexual de *M. galloprovincialis*, apresentando um apanhado bibliográfico sôbre a variação das épocas de maturação sexual. Embora se trate de localidades onde as estações do ano são em geral bem delimitadas, as épocas de maturação sexual dêstes moluscos não se acham todavia bem definidas.

Os trabalhos compulsados, principalmente os de Lubet (1959), de Renzoni (l.c.) e outros, informam que nos fenômenos da maturação sexual interferem vários fatores tais como: temperatura, salinidade, zonação, disponibilidade e natureza

do plancton. Além disso, a própria histologia e os constituintes bioquímicos das gônadas, mostram características importantes, durante o ciclo sexual, como por ex. o desenvolvimento e regressão do tecido conjuntivo inter-folicular (Lubet 1959, p. 47; Renzoni 1961, p. 48).

Com referência aos constituintes químicos, deve-se lembrar que durante os fenômenos de gametogênese há uma variação intensa da quantidade de glicogênio e lipídeos. Em *M. galloprovincialis* da região de Eyrac, Lubet (1959, p. 57) mostra que o teor em lipídeos decresce intensamente após a emissão dos gametas. Em outros moluscos como por ex., no caracol *Pila virens*, Meenakshi (1956, p. 62) verificou que durante a reprodução o teor de glicogênio cai consideravelmente tanto nos machos como nas fêmeas.

Visando o «Programa Mytilus» principalmente proporcionar o conhecimento tão completo quanto possível da biologia das Mytilidae do litoral brasileiro, as informações que se colherem sobre a vida dos mesmos, representarão contribuição importante para a execução dos referido programa.

Além disso, havendo o risco cada vez maior da extinção das reservas naturais dos mexilhões, urge obter o maior número possível de dados para o estabelecimento de diretrizes que visem, não somente manter as referidas reservas, como possibilitar o repovoamento das regiões onde não mais se encontram as Mytilidae, e em que outrora eram tão abundantes.

Com estas perspectivas e tendo por objetivo principal e preliminar conhecer algumas peculiaridades do desenvolvimento sexual das Mytilidae, e tomando por base um estudo histofisiológico, procurarei no presente trabalho abordar os seguintes tópicos:

- a) citologia e citoquímica das gônadas durante a gametogênese.
- b) lise oocitária
- c) o ciclo sexual e suas modalidades
- d) análise da ocorrência dos diferentes estádios

- e) comparação entre a duração do ciclo sexual de *Mytilus perna* com o de outras Mytilidae
- f) tecido conjuntivo interfolicular.

2.

O MATERIAL E SUA PROCEDÊNCIA

Restringi o estudo ao *Mytilus perna* Linné, 1758, proveniente da baía de Santos (Ilha de Urubuqueçaba — 23°47'8"S; 46°22'25"W) e do litoral de São Sebastião (23°48'7"S; 45°23'29"W). Estes últimos foram coletados nos flutuadores do pôrto de São Sebastião e também nas rochas da praia do Toque-Toque Pequeno, situada à cerca de 10 km ao sul da cidade de São Sebastião. Os animais foram transportados para o laboratório que o Instituto de Biologia Marinha mantém na Praia do Segrêdo. Aí eram devidamente colocados sobre cordas e conservados no parque de criação de *Mytilus* da Praia do Cabelo Gordo de Dentro.

O material foi determinado no Museu de Zoologia Comparada da Universidade de Harvard e, pelo menos até agora admite-se que a espécie com que trabalhei é *Mytilus perna*. Devo aduzir, porém, que estudos recentes de Klappenbach (1964) informam que a espécie de mexilhão mais comum no Atlântico Sul é *Perna perna*.

A determinação das Mytilidae do litoral paulista é trabalho que se acha em andamento, a até que se resolva a questão mantereí a classificação feita no Museu de Zoologia Comparada da Universidade de Harvard. Dada essa divergência, tive o cuidado de conservar grande número de amostras de todo material estudado, para compará-lo com os exemplares que estão servindo para o estudo taxonômico.

Deve-se lembrar ainda que a taxonomia das Mytilidae constitui problema que está a exigir solução urgente, pois autores há que preferem considerar *M. galloprovincialis* variedade de *M. edulis*. Fischer Piette (1955, p. 108) e Bouxin (1954)

opinam que se trata apenas de uma espécie com grande variabilidade e que os fenótipos «*edulis*» e «*galloprovincialis*» não passam de formas limites entre as quais todos os intermediários podem existir. Segundo Lubet (1959, p. 15), estas variações estariam na dependência de fatores bióticos diversos reinantes nos diferentes locais por êle estudados. Hancock 1965, p. 267) estudando *M. edulis* das costas dinamarquesas e das costas britânicas, não faz menção à diferenças morfológicas externas porém, acentua a grande variabilidade em tamanho do músculo adutor dêsses animais de acôrdo com os diferentes biotópos.

A simples comparação do enorme número de exemplares com que trabalhei, confirma as observações realizadas pelos autores precedentes. O estudo taxonômico dos mexilhões das regiões tropicais relacionado com a ecologia, em face do exposto anteriormente seria desejável a fim de se conhecer as divergências morfológicas de uma mesma espécie quando em habitats diferentes.

As técnicas empregadas, por variarem em cada estudo, serão descritas nos capítulos respectivos.

Agradecimentos:

Aproveito a oportunidade para agradecer ao Dr. Paulo Sawaya, Diretor do Depto. de Fisiologia Geral e Animal e do Instituto de Biologia Marinha da Universidade de São Paulo pelas facilidades concedidas no desenvolver dêste trabalho bem como pela orientação do mesmo. Ao Prof. Dr. Pierre Lubet, pelo apoio, interêsse e incentivo durante o meu estágio sob sua orientação em Lyon e Tamaris; ao Governo Francês pela bolsa concedida; à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo auxílio concedido. À UNESCO, especialmente ao Dr. K. N. Fedorov e Dr. Howell Rivero, pela bolsa concedida para os diversos estágios realizados nos laboratórios de biologia marinha de diversas universidades européias. Enfim, a todos os amigos e colegas do Departamento de Fisiologia que colaboraram na coleta dos animais e manutenção do parque de criação dos mexilhões em São Sebastião.

3.

CITOLOGIA E CITOQUÍMICA DAS GÔNADAS DURANTE A GAMETOGENESE

As Mytilidae são em geral gonocóricas. O hermafroditismo é muito raro como verificou Lubet (1959, p. 25) em *M. edulis* no qual encontrou em cada 1000 espécimes examinados, apenas um hermafrodita e em *M. galloprovincialis* a proporção foi ainda menor, pois a relação é de 1/5000 entre monóicos e dióicos. Embora Renzoni (1961, p. 56) tenha indicado a proporção de 1/1000 em *M. galloprovincialis*, ainda assim se pode considerar bastante raros os casos de hermafroditismo nesta família de Lamelibrânquios. Em cerca de 5000 exemplares de *M. perna examinados* não encontrei um único caso de hermafroditismo.

Para o estudo da Gametogênese o manto de animais de diferentes idades, avaliadas pelo comprimento, foi fixado em Gendre, Navashim, Susa ou Helly, dos quais o segundo fixador se mostrou mais favorável.

Cortes de 5 μ em média, foram corados pela hematoxilina-eosina para o exame geral, de modo a permitir uma avaliação preliminar da estrutura do órgão durante as diferentes fases do ciclo sexual. Utilizei o verde de metil-pironina para o estudo dos ácidos nucleicos e subsequente controle pela ribonuclease; a técnica de McManus ou P.A.S. para verificar a ocorrência do glicogênio; a reação de Feulgen para análise dos núcleos e finalmente, o tricrômico de Masson para o estudo anatômico. Para a pesquisa dos glucídeos e lipídeos fixaram-se respectivamente em Gendre, formol salino a 10% e em formol Baker a 5% pequenas porções de manto de animais em diferentes estádios do ciclo sexual.

Passarei agora a apresentar, embora de modo sumário, os resultados das análises das preparações obtidas correspondentes às diferentes fases do ciclo sexual.

a) *Espermatogênese*

A espermatogênese em *M. perna* é um fenômeno mais ou menos contínuo com intensidades variáveis, como se verá a seguir. A identificação dos diferentes tipos de células em um «folículo» e as relações entre elas não é fácil de se estabelecer, Estudarei os aspectos mais interessantes das células mães dos espermatogônios, dos próprios espermatogônios e dos espermatozoides.

1 — *Células mães dos espermatogônios* (Fig. 1, cm)

São muitos difíceis de discernir; suas características assemelham-se às das descritas por Lubet (1959, p. 29) em *M. edulis* e *M. galloprovincialis*, i.é, em geral são irregulares, alongadas e dispostas paralelamente à parede do folículo, oscilando suas dimensões entre 9 e 12 μ . O núcleo mede de 7 a 10 μ de diâmetro, sendo provido de cromatina escassa e de aspecto granular. Pouca quantidade de RNA no citoplasma e ausência completa de reservas glucídicas e lipídicas. Pelas características descritas lembram as «indifferent germ cells», citadas por Loosanoff (1937, p. 400) e Quayle (1943, p. 143). Assemelham-se ainda às chamadas «stem cells» descritas na ostra *Pincta albina* por Tranter (1958, p. 146).

2 — *Espermatogônios* (Fig. 1; e₁ - e₂)

Originam-se da multiplicação das células mães dos espermatogônios, apresentando menor tamanho que as originais, variando de 6 a 8 μ o diâmetro celular e de 4 a 7 μ o do núcleo. Apresentam muito pouco citoplasma. Podem, às vezes, permanecer aderidos à parede dos folículos. Há uma diminuição gradativa do citoplasma entre os diferentes estágios dos espermatogônios desde a célula mãe até a formação dos espermatozônio definitivo. Nos ácinos das gônadas podem-se notar duas ou mais camadas periféricas de espermatogônios, as quais se originam pelas diversas mitoses espermatogoniais.

3 — *Espermatócitos* de 1.^a e 2.^a ordem (Fig. 1 e Fig. 2 — e 1' - e 2')

Os espermatócitos primários são originados diretamente do espermatogônio definitivo, pelo crescimento do núcleo. São reconhecíveis pela atividade nuclear avaliada pelo Feulgen e pelo tamanho das células. Os espermatócitos de 1.^a ordem variam de 6 a 7 μ e os de 2.^a de 3 a 4 μ com citoplasma pouco abundante. Dispõem-se em forma radial convergindo para o centro do folículo da gônada.

4 — *Espermatídios e espermatozóides* (Fig. 1 e Fig. 2 — S; Sp.)

Os espermatídios como de hábito, muito se assemelham aos espermatócitos de 2.^a ordem. As poucas diferenças são: o citoplasma dos primeiros apresenta vacúolos, o núcleo é pouco distinto, havendo na periferia do citoplasma condensação de grânulos, o que não ocorre nos espermatócitos de 2.^a ordem os quais se apresentam com o núcleo ocupando quase todo o volume celular e a cromatina é condensada.

Os espermatozóides formam-se no centro do folículo; a cabeça tinge-se de forma homogênea e intensamente. Bourcart, Lavallard e Lubet (1965, p. 5096), estudaram o espermatozóide de *M. perna* ao microscópio eletrônico verificando que o mesmo possui um longo acrosoma de estrutura complexa, compreendendo em particular um sistema de formações periféricas densas. Um filamento axial rígido, apresentando um aspecto fibroso e uma estriação transversal de periodicidade que varia de 130 a 150 Å está inserido numa diferenciação sub-acrosômica e introduzido na massa nuclear. Lembram os autores, p. 5099) que os caracteres dos espermatozóides de *M. perna* apresentam o esquema geral dos de *M. edulis* descritos por Nijima (1963, p. 217).

b) *Oogênese*

Tal como acontece na espermatogênese, a oogênese de *M. perna* constitui fenômeno cuja intensidade também varia com

as diferentes fases do ciclo sexual. Como é natural, os dois fenômenos são bastante diferentes, e a seguir darei, sumariamente, os principais resultados das análises de preparações histológicas do manto de *M. perna* em várias fases da reprodução.

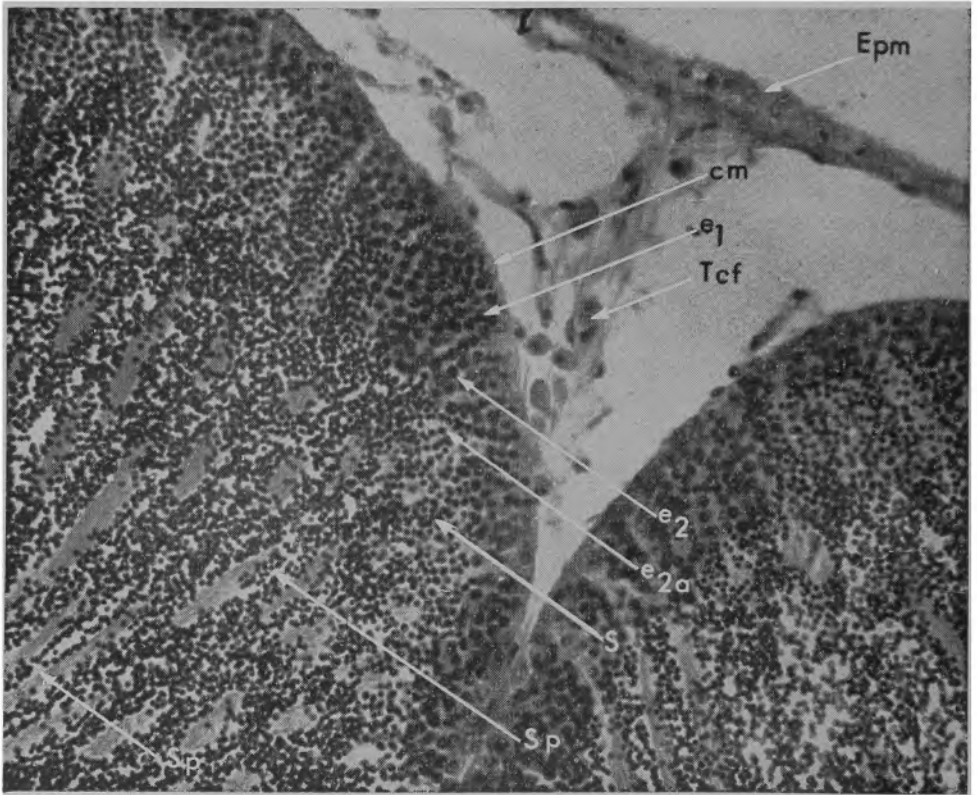


Fig. 1 — Secção do manto de *M. perna*, macho. Estado III_{A1}. Estratificação na periferia do folículo das células que originam os espermatozóides. cm; célula mãe dos espermatogônios; e₁: espermatogônio de 1.^a ordem; e₂: espermatogônio de 2.^a ordem; e₂^a: espermatócito de 2.^a ordem; S: espermátide; Sp: espermatozóide; Epm: epitélio do manto; Tcf: tecido conjuntivo interfollicular. x545

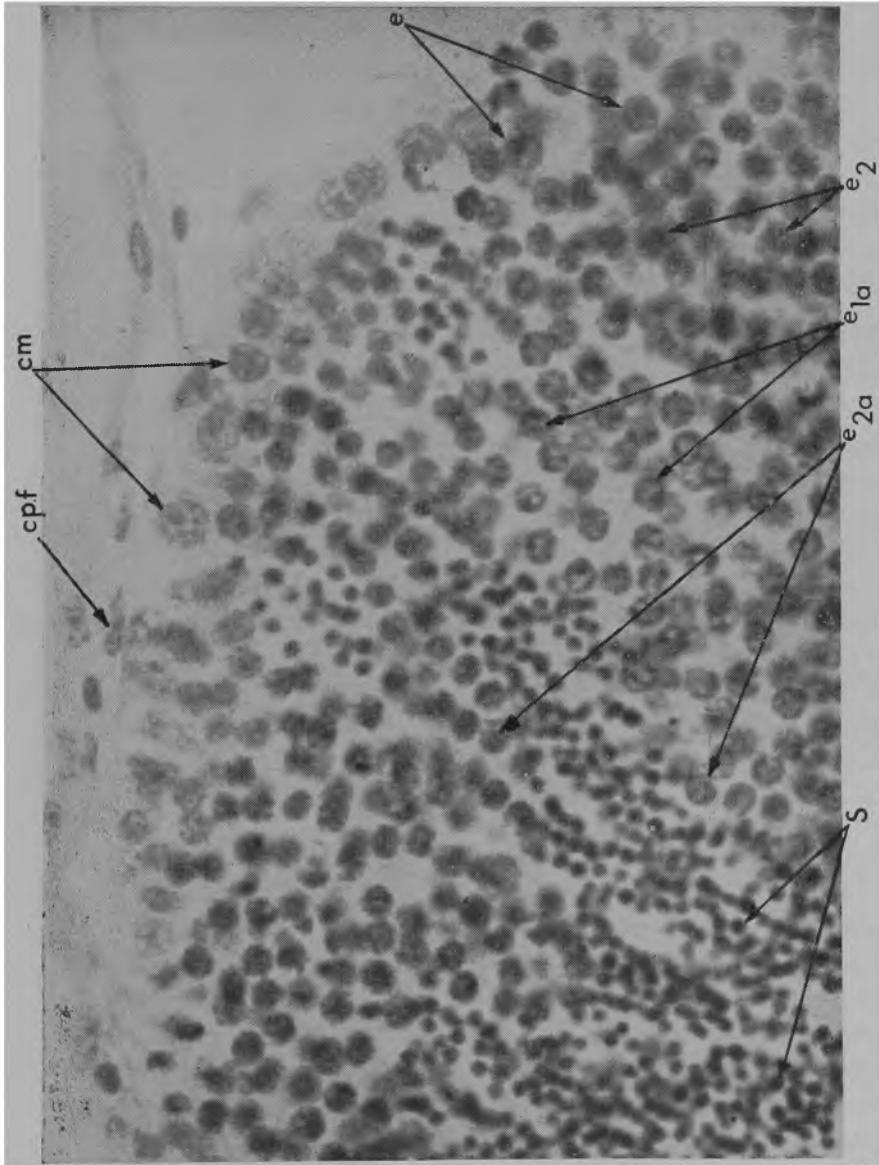


Fig. 2 — Secção do manto de *M. perna*, macho. cm:célula mãe dos espermatogônios; e₁:espermátogônio de 1.^a ordem; e₂:espermátogônio de 2.^a ordem; e₁^a:espermátócito de 1.^a ordem; e₂^a:espermátócito de 2.^a ordem; S:espermátide; cpf:célula da parede do folículo. x870

1 — *Células mães das oogônias*

Têm a mesma origem que as células mães dos espermato-gônios e as mesmas características histoquímicas e biométricas. Não há diferença a assinalar entre as células mães que dão origem às oogônias e às espermatogônias.

A oogênese (Fig. 3) ocorre em duas fases nas quais se notam diferentes aspectos citológicos e histoquímicos, a saber:

a) *Previtelogênese* (Fig. 3 - Pv)

O crescimento celular é limitado. Assiste-se à formação de numerosos nucléolos acessórios, dependendo da quantidade de RNA do nucléolo principal. Esses nucléolos acessórios localizam-se junto à membrana nuclear e daí passam ao citoplasma perinuclear. Assim, durante a previtelogênese o citoplasma enriquece-se em RNA (Fig. 3).

Fêz-se a identificação do RNA pelo verde de metil pironina, sendo alguns cortes tratados previamente pelo ácido clorídrico, segundo a técnica de Vandreley-Randavel (1949, p. 600) porém, dada a controvérsia ainda existente sobre o valor desta técnica, a presença de RNA foi comprovada pelo tratamento de outros cortes com ribonuclease. O desaparecimento comprovou realmente, tratar-se de RNA a substância que passa nesta fase para o citoplasma.

b) *Vitelogênese* (Fig. 3-V)

Os fatos importantes que assinalam esta fase são os seguintes: o ciclo nucleolar, i. é, as modificações que sofrem os nucléolos nestes dois períodos, continuam até o fim da vitelogênese com emissão de nucléolos satélites ricos em RNA e passagem dêste para o citoplasma. Contrariamente ao verificado por Lubet (1959, p. 35) em *M. edulis*, os oócitos no término da vitelogênese contêm uma quantidade importante de RNA, o qual pode formar aglomerados que lembram núcleos vitelinos. O aparecimento do vitelo segue uma seqüência bem determinada. Primeiramente, notam-se os mucopolisacarídeos

ácidos caracterizados pelo azul de alcian; a seguir os glúcídeos, tal como o glicogênio, P.A.S. positivo. Os lipídeos surgem imediatamente e, após êles, os elementos protéicos. Utilizou-se para comprovação dos mucopolisacarídeos ácidos o controle pela metilação e para o glicogênio controle pela técnica da digestão salivar. Todavia, contrariamente ao que ocorre com o *M. galloprovincialis* (Bourcart e Lubet 1964, p. 1) os mucopolisacáridos ácidos desaparecem no fim da vitelogênese. Sòmente micro-análises poderiam confirmar esta seqüência do aparecimento das reservas citoplasmáticas. A julgar, porém, pelo que acontece nos oócitos de *Phascolosoma vulgare*, segundo os estudos de Gonse (1956, p. 198), acredito que a seqüência seja a mesma.

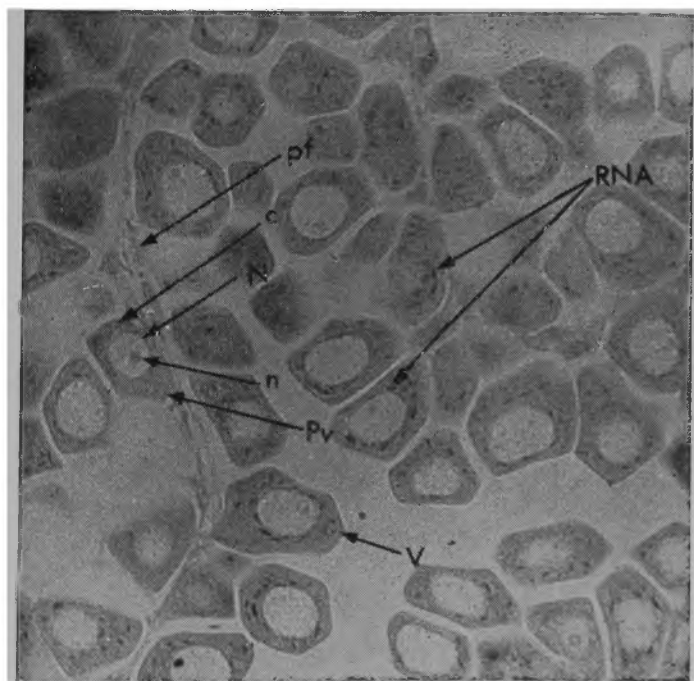


Fig. 3 — Secção transversal do manto de *M. perna*, mostrando aspectos da oogênese. c: citoplasma; N: núcleo; n: nucléolo; o: oogônia; pf: parede folicular; Pv: oócito na previtelogênese; RNA: escamas de RNA no citoplasma dos oócitos; V: oócito em vitelogênese. x365



Fig. 4 — Inclusões lípidicas nos oócitos e no tecido conjuntivo de *M. perna*. c: citoplasma; N: núcleo; n: nucléolo; o: oogônia; l: inclusões lípidicas no oócitos; ITc: lípidos no tecido conjuntivo; pf: parede folicular x545

Resta ainda saber em que medida os mucopolisacarídeos seriam uma fonte de energia utilizável posteriormente, durante o curso da oogênese, o que talvez venha explicar sua fraca quantidade no fim da vitelogênese. Deve-se assinalar, todavia, que entre os lipídeos se encontram, lipídeos neutros e fosfolipídeos. Estas inclusões lipídicas (Fig. 4) tornam-se mais abundantes e conferem uma cor salmão ou amarelo alaranjado aos oócitos no fim de maturação. Durante a vitelogênese o núcleo sofre um crescimento importante pois, ao terminar esta fase passa a apresentar um diâmetro de 25 a 30 μ para uma célula cujo maior diâmetro não ultrapassa de 70 a 65 μ .

Com o prosseguimento da vitelogênese aumenta o tamanho dos oócitos os quais apresentam mudanças de forma.

Na previtelogênese (Fig. 3) as células estavam fortemente aderidas às paredes do folículo porém, o acúmulo de reser-

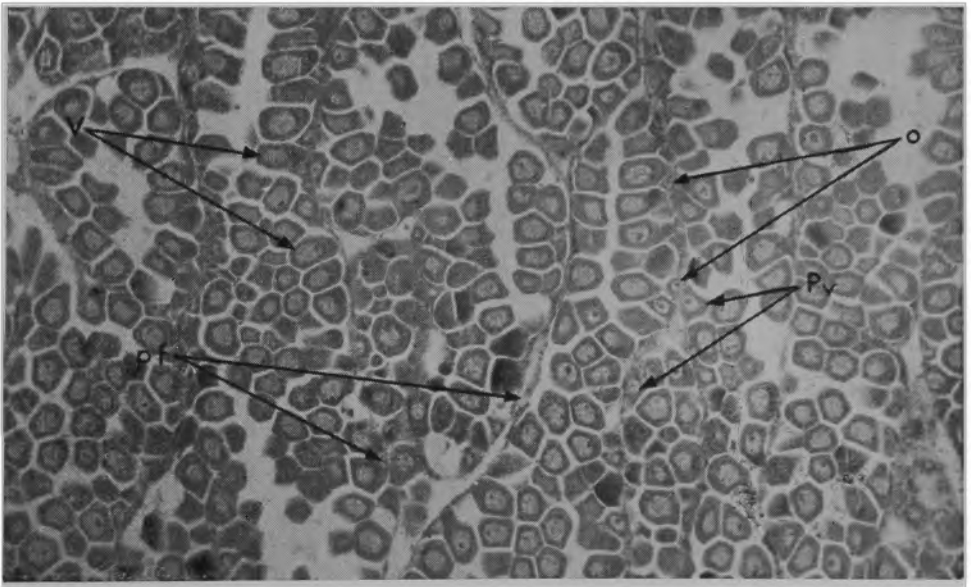


Fig. 5 — Seção transversal do manto de **M. perna** fêmea. Folículos repletos de oócitos de contorno poligonal. c: citoplasma; o: oócito; pf: parede folicular; Pv: oócito em previtelogênese. V: oócito em vitelogênese. x135

vas levou-as a se alongarem dispondo-se perpendicularmente à parede do folículo, fazendo saliência no interior do mesmo. Devido a isso, os oócitos (Fig. 5) têm agora contornos poligonais, bem justapostos uns aos outros, com o núcleo ocupando o centro celular, obstruindo completamente a luz do folículo. Ao findar a oogênese, o núcleo do oócito não se apresenta rico em cromatina e na fase final de maturação pode chegar a ter o maior diâmetro variando entre 60 a 80 μ .

Os oócitos encontram-se envolvidos por uma camada mucosa (Fig. 6) de natureza polissacarídica. Esta substância desenvolve-se ao fim da vitelogênese, formando uma espécie de cimento entre os oócitos e pode subsistir «in situ» após a eliminação dos gametas porém, a maior parte é arrastada pelos oócitos.

Sob o ponto de vista histoquímico, esta substância não deixa de lembrar a «jelly coat» dos ovos de ouriço embora, não tenha grande desenvolvimento como nos Equinodermes (Vasseur 1952, p. 9). Essa substância reage positivamente ao P. A. S. resistindo à digestão salivar. Cora-se em azul pelo azul de Alcian, o que permitiria supor, tratar-se de uma glicoproteína ou uma substância contendo mucopolisacarídeos ácido.

Lubet (1959, p. 137) mostrou que esta «camada mucosa» não se desenvolvia nos oócitos de *M. edulis* e *M. galloprovincialis*. Igualmente indicou que a «egg water» (Lubet, l.c., p. 132) destas espécies era sem ação sobre o esperma dos animais da mesma espécie, pois não provocava nenhuma reação de aglutinação nem de ativação do espermatozóide.

A presença desta camada mucosa induz retomar ulteriormente o assunto referente ao efeito da «egg Water» sobre os espermatozóides de *M. perna*.

Lise Oocitária

Lubet (1959, p. 44) e Bourcart e Lubet (1963, p. 1638) verificaram em *M. edulis* e *M. galloprovincialis* que quando a temperatura da água era muito baixa não havia eliminação dos gametas. Não obstante isso, a vitelogênese dos jovens

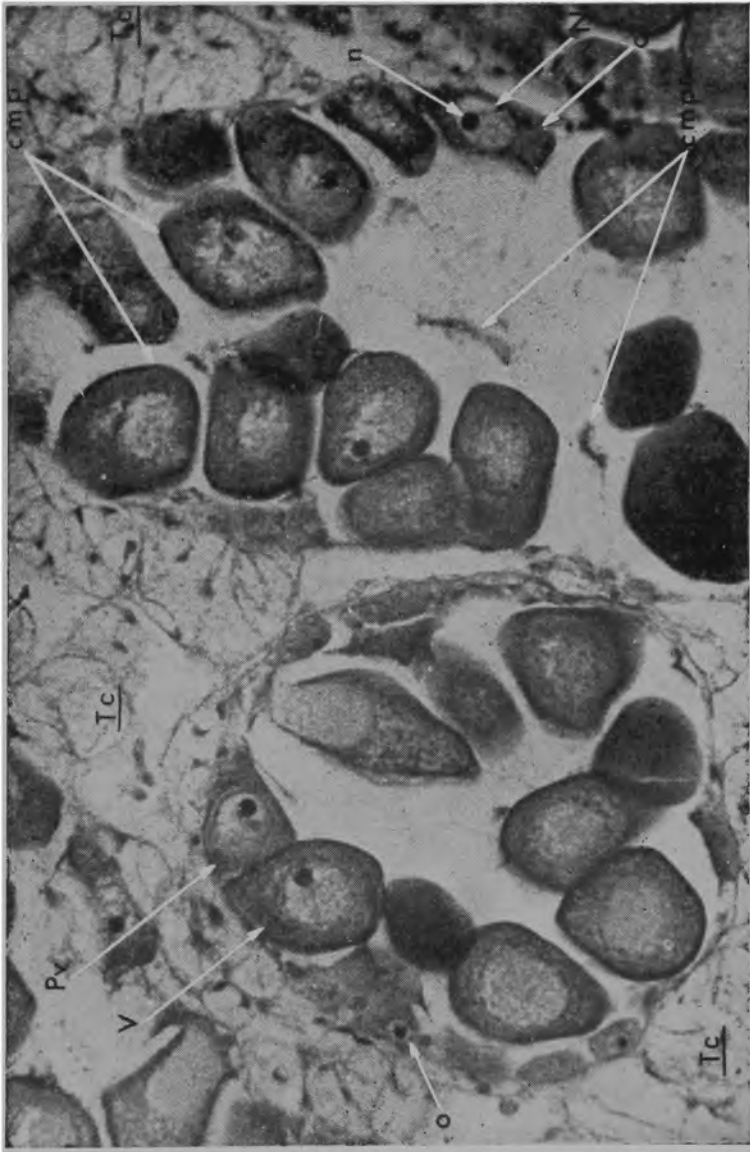


Fig. 6 — Seção transversal do manto de *M. perna* fêmea. Camada de mucopolisacárideo em torno dos oócitos. c: citoplasma; N: núcleo; n: nucléolo; o: oócito; Pv: oócito em previtelogênese; V: oócito em vitelogênese; cmp: camada de mucopolisacárideo em torno das células; cmpr: camada de mucopolisacárideo remanescente dos oócitos eliminados. x345

oócitos prosseguia normalmente. O crescimento destas células promove a compressão dos oócitos já formados. Poderia não ocorrer a emissão dos gametas ou ser ela apenas muito parcial e, dêste modo, os oócitos poderiam sofrer a lise «in situ» i.é dentro do folículo. Pérez e Kostitzine (1930, p. 1270) observaram fenômeno semelhante em *Turitela*, porém não o relacionaram com a temperatura ambiente.

O fenômeno da lise oocitária foi interpretada por Lubet (1. c. p. 60) como sendo devido à ação do frio e como consequência dêste fenômeno, haveria a reabsorção das substâncias contidas nos oócitos.

Em *M. perna* o fenômeno é o mesmo como em *M. edulis* e *galloprovincialis*, mas dadas as condições do ambiente em que vive, deve ter outra origem. Diversamente do que ocorre em *M. edulis* e *M. galloprovincialis*, em *M. perna*, nos animais em cujos folículos se manifesta a lise oocitária, um dos primeiros indícios dêste fenômeno é a vacuolização do citoplasma na periferia do oócito (Fig. 7 e 8). Tudo se passa como se houvesse uma dissolução do citoplasma, com desaparecimento da membrana celular, acarretando como consequência a liberação do material citoplasmático e nuclear para o interior do folículo.

Fato curioso a assinalar é que nos oócitos onde ocorre a vacualização da porção mais periférica do citoplasma (fig. 8) há completo desaparecimento das estruturas ergastoplásmicas citadas anteriormente, como se houvesse, previamente, uma dissolução no interior do citoplasma, i.é, antes do conteúdo citoplasmático e nuclear serem liberados pela ruptura da membrana celular no interior dos folículos.

A análise percentual dos animais que apresentam oócitos em lise, mostra que êste fenômeno é particularmente importante em março, época em que 100% dos oócitos estavam em via de lise. Esta proporção é fraca em janeiro e aumenta um pouco em fevereiro, para atingir o máximo em março e depois diminuir no mês seguinte, sendo quase nula no resto do ano.

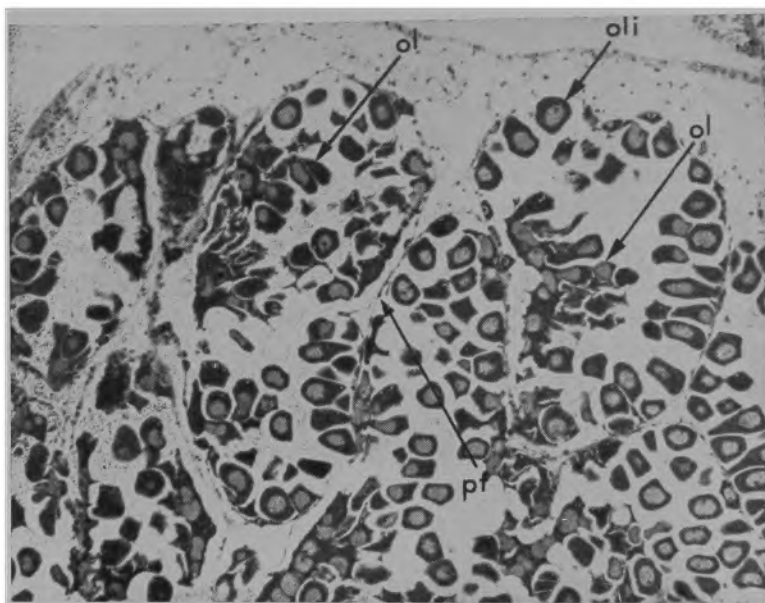


Fig. 7 — Seção transversal do manto de **M. perna** fêmea. Lise dos oócitos. Oli: oócito íntegro; Ol: oócito em lise; pf: parede folicular. Fixador: líquido de Navashin e coloração pelo tri-crômico de Masson. X345

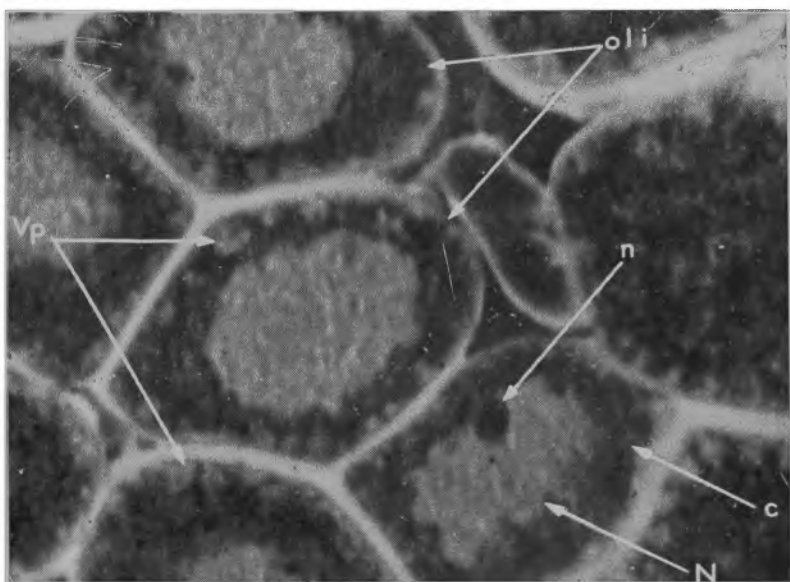


Fig. 8 — Pormenor da foto n.º 7, mostrando a vacuolização do citoplasma. c: citoplasma; N: núcleo; n: nucléolo; oli: oócito em lise Vp: vacúolos citoplasmáticos periféricos. X870

Êstes fatos agora observados induzem a admitir uma estreita relação entre as reservas de lípídeos e principalmente de glucídeos e os fenômenos que ocorrem durante a gametogênese. Reforça esta hipótese o fato de em fevereiro haver uma brusca diminuição de reserva daquelas substâncias com elevação da taxa de glicogênio em março. Ora, nesta época os animais estão em pleno período de gametogênese e a nova repleção do tecido conjuntivo vesicular em glucídeos poderia bem provir de metabolitos liberados pela lise dos oócitos. É evidente que esta hipótese demanda confirmação, o que se espera obter em trabalhos futuros.

Após a emissão dos oócitos ocorre a «limpeza» dos folículos mesmo no caso de total emissão dos gametas, pois ainda aqui numerosos são os detritos que ficam no folículo.

No caso de o tecido conjuntivo que circunda os ácinos glandulares das gônadas ser bem desenvolvido e rico em glicogênio e lipídeos os detritos desaparecem pouco tempo após a emissão dos gametas. Mas se o tecido conjuntivo desapareceu ou regrediu completamente, o que ocorreu em maio de 1963 e se repetiu em maio de 1964, os oócitos residuais e os detritos são fagocitados. Na realidade, podem-se distinguir após a emissão dos gametas numerosos amebócitos também conhecidos por leucócitos granulosos ou granulócitos nos espaços interfoliculares. Êstes granulócitos (Fig. 9) penetram nos folículos no estágio III_B, e fagocitam os detritos e, assim, os granulócitos desaparecem quando se inicia a restauração dos folículos (estádio III_C), porém, serão reencontrados entre os espaços dos folículos, com o citoplasma rico em glicogênio demonstrado pela reação positiva ao P.A.S. e controle pela digestão salivar e acetilação. Durante a restauração dos folículos das gônadas (estádio III_C) êstes granulócitos perdem as reservas glucídicas e, daí pensar-se que estas células exerçam a função de recuperação e de reposição dos metabolitos na circulação durante o curso da fase de restauração dos folículos, suprimindo parcialmente a função de reserva do tecido conjuntivo que não mais existe neste período do ano, como adiante se verá.

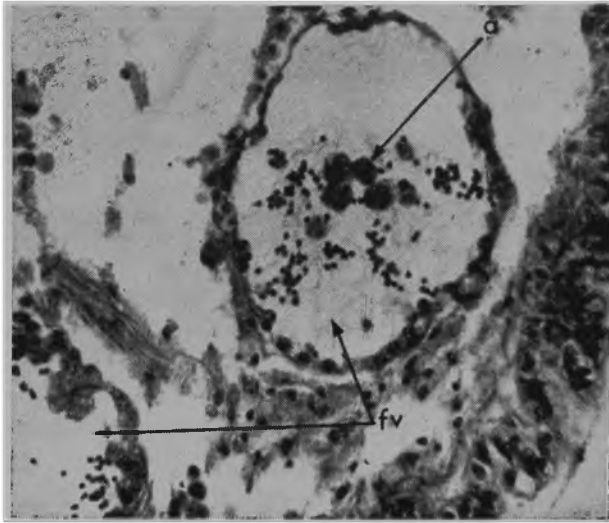


FIG. 9. Secção transversal do manto de *M. perna* macho. Limpeza dos folículos pelos amebócitos após a eliminação dos espermatozóides. a: amebócito; fv: folículo vazio. Fixação pelo líquido de Gendre e reação ao P.A.S. X 350.

5.

O CICLO SEXUAL E SUAS MODALIDADES

A análise microscópica dos vários estádios sexuais de uma população, tendo por base a biópsia da gônada e confirmada ulteriormente com preparações microscópicas, mostrou a existência de estreita relação entre os diferentes aspectos examinados.

É possível estabelecer uma escala das características do manto, distinguíveis a olho nu, correspondente aos diversos aspectos das gônadas, durante as diferentes etapas da gametogênese. Chipperfield em 1953, ao estudar o *M. edulis* propôs uma classificação que foi adotada por Lubet em 1956 em suas investigações sobre *M. edulis* e *M. galloprovincialis*. Seguirei os referidos autores no estudo do *M. perna*.

Chipperfield (1953, p. 451) denomina *estádio O* a fase correspondente ao repouso sexual, na qual se nota a ausência dos folículos funcionais da gônada.

O início do desenvolvimento dos folículos, *estádio I*, caracteriza-se pela perda do aspecto homogêneo do manto, devido aos primeiros esboços dos folículos.

No *estádio II*, os esboços foliculares são mais nítidos, e o curso da gametogênese bem ativo.

Por fim, no máximo de desenvolvimento dos folículos e de espessura do manto, *estádio III*, os animais atingem à maturidade sexual. Nesta fase poder-se-ão encontrar os animais em estádios diferentes de emissão dos gametos.

A) *Exame macroscópico de M. perna*

As biópsias das gônadas durante os estádios sexuais revelaram o seguinte:

Estádio I — Marcado pela presença dos esboços foliculares das gônadas, não sendo ainda possível distinguir-se através da cor do manto, os machos das fêmeas. Minhas observações neste particular não diferem das de Chipperfield (1.c.) e das de Lubet (1.c.).

Estádio II — Os folículos são bem visíveis com diferenciação do colorido que passa a ser branco nos machos e salmão nas fêmeas. Este fato dá ao manto aspecto já bem característico.

Estádio III — É possível ser dividido, mesmo macroscopicamente, em sub-estádios, pois ocorrem fenômenos típicos que determinam aspectos distintos. Nas fêmeas, o manto é alaranjado e nos machos branco-creme. Os sub-estádios são:

III_A — repleção total dos folículos pelos gametas;

III_B — esvaziamento parcial ou total dos folículos, o que determina menor espessura do manto. Este fato confere ao manto aspecto especial;

III_C — é a fase de restauração da gônada, havendo maior nitidez dos folículos, diferenciando-se do estágio I por apresentar a cor característica de cada sexo. Nêste estágio os animais ainda conservam as cores típicas do manto porém, mais atenuadas; é sempre interessante fazer um esfregaço do mesmo, pois, devido à pequena quantidade de gametas remanescentes, pigmentos alaranjados podem estar presentes no epitélio do manto e mascarar a cor própria dos gametas.

B) *Exames microscópicos do manto*

a) Estádio III_{A1}: há repleção da gônada

1. *Machos*: Caracterizam-se por apresentar ácinos com espermatozóides maduros e mitoses numerosas e, devido a isto além dos elementos que terminaram seu desenvolvimento, encontram-se espermátócitos de 1.^a e 2.^a ordem e um grande número de espermátides. Todavia, os animais já podem responder a estímulos externos que provocam emissão dos gametas. Os espermatozóides distribuem-se de forma radial (Fig. 1), convergindo para o centro do folículo.

2. *Fêmeas*: Os ácinos das gônadas aparecem providos de numerosos oócitos em curso de vitelogênese, enquanto que outros já terminaram o crescimento. Êstes últimos, com maior diâmetro variando entre 60 a 80 μ e os núcleos muito transparentes, com pouca cromatina. As células de contornos poligonais (Fig. 5) são comprimidas umas contra as outras.

b) Estádio III_{A2}

1. *Machos*: Espermátócitos de 1.^a e 2.^a e espermátides terminam seu desenvolvimento. Os ácinos encerram somente espermatozóides (Fig. 10), os quais começam a perder a distribuição típica nos ácinos da gônada. Há uma desorganização da forma radial convergindo para o centro do folículo. Encontram-se na periferia do folículo, mesmo nesta fase, algumas camadas de espermátogônios. Nesta fase, os animais respondem intensamente aos estímulos que induzem à emissão dos espermatozóides.

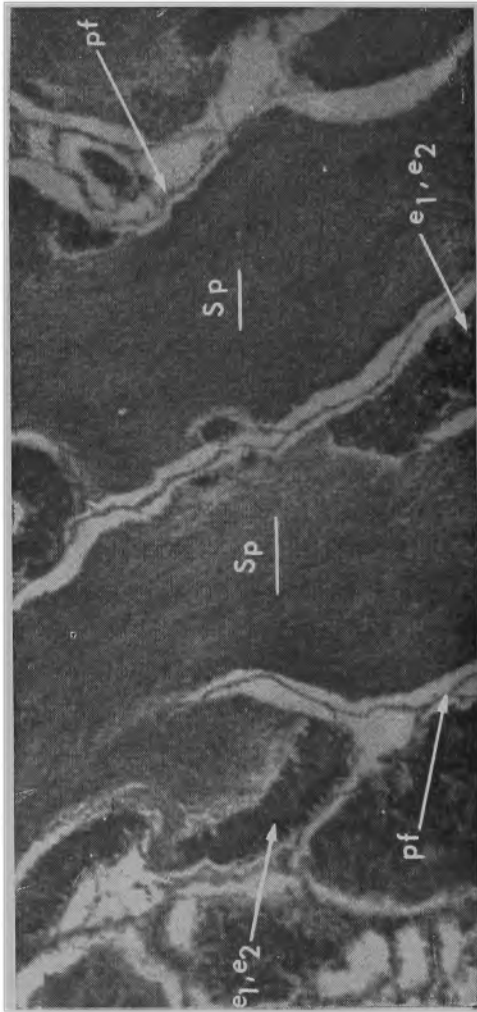


Fig. 10 — Seção transversal do manto de *M. perna* macho estágio IIIA₂, mostrando a típica disposição dos espermatócitos, próxima a época de emissão dos mesmos. e₁, e₂: espermatogônios; Sp: espermatócito; pf: parede folicular. Fixador líquido de Navashin, tricrômico de Masson. X135

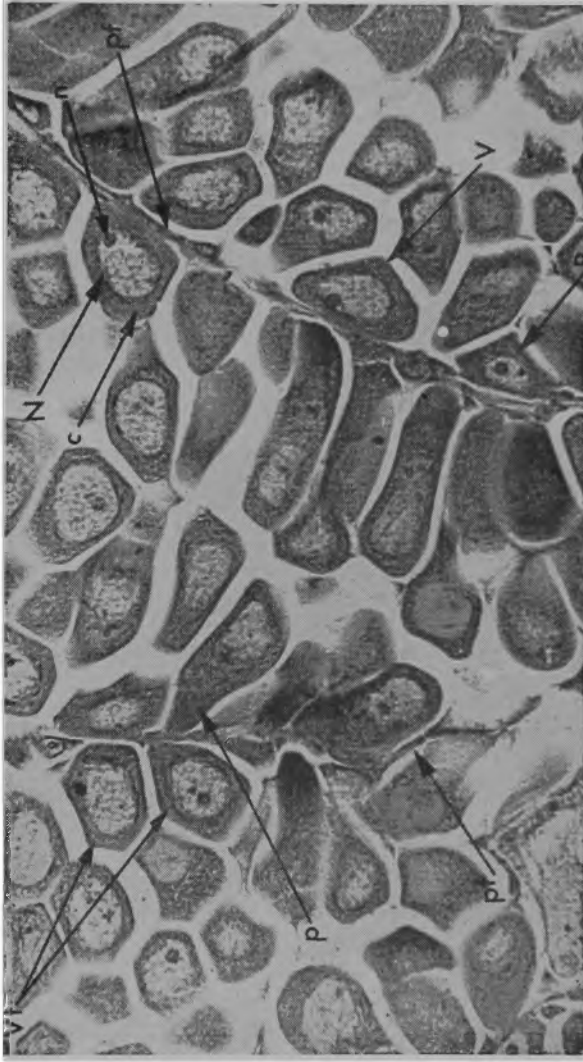


Fig. 11 — Seção transversal do manto de *M. perna* fêmea estágio IIIA₂, mostrando oócitos que terminaram seu desenvolvimento enquanto que outros continuam a se desenvolver. c: citoplasma; N: núcleo; Pv: oócito previtelogênico; V: oócito em vitelogênese; Vt: oócito de contorno polygonal pronto a ser emitido; p: pedúnculo do oócito. Fixação e coloração como fig. anterior. X550

2. **Fêmeas:** Os oócitos (Fig. 11) que terminaram o desenvolvimento apresentam ligeira acentuação da forma poligonal, existindo ainda alguns com forma mais ou menos ovoidal. O pedúnculo que os liga à parede do folículo é mais alongado que nos do estágio anterior, em outros oócitos êle já se rompeu e êstes passam a ocupar livremente o centro do folículo.

c) Estádio III_B

Tanto para machos como para fêmeas é a fase de esvaziamento (Fig. 12 e 13) dos folículos. Embora haja enorme emissão de gametas, podem permanecer nos folículos gametas residuais. O manto torna-se de espessura consideravelmente reduzida em relação às fases anteriores. Nos machos é mais evidente, na borda dos folículos, a permanência de espermatogônios.

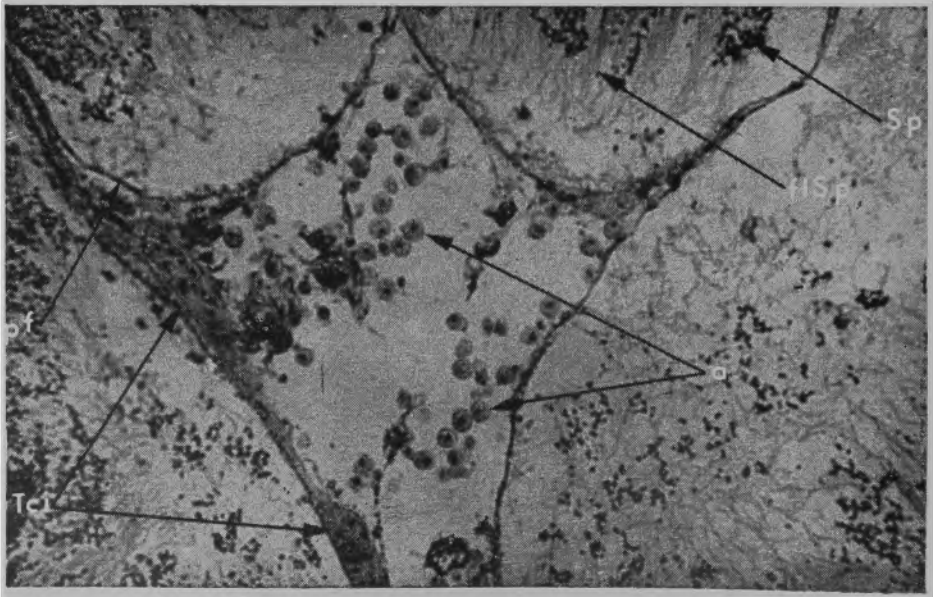


Fig. 12 — Macho - estágio III_B mostrando os folículos praticamente vazios de *M. perna*. a: amebócito; flSp: flagelos dos espermatozóides; pf: parede folicular; Sp: espermatozóide; Tci: tecido conjuntivo interfolicular em desenvolvimento. Fixação no líquido de Gendre e reação ao P.A.S. X345

d) Estádio III_C

Característico para os machos e fêmeas, pois, nos folículos praticamente não há gametas maduros. Encontra-se na parede dos folículos dos machos, espermatogônias e nos das fêmeas ovogônias e oócitos em início de vitelogênese.

e) Estádio III_C A₁

Assinalado pelo final de uma emissão e o início de outra, ou seja, situa-se entre duas emissões sucessivas.

1. *Machos*: Desenvolvem-se no folículo novos aspectos da espermatogênese. Os espermatogônios que se situavam na periferia do folículo entram em divisões ativas, havendo

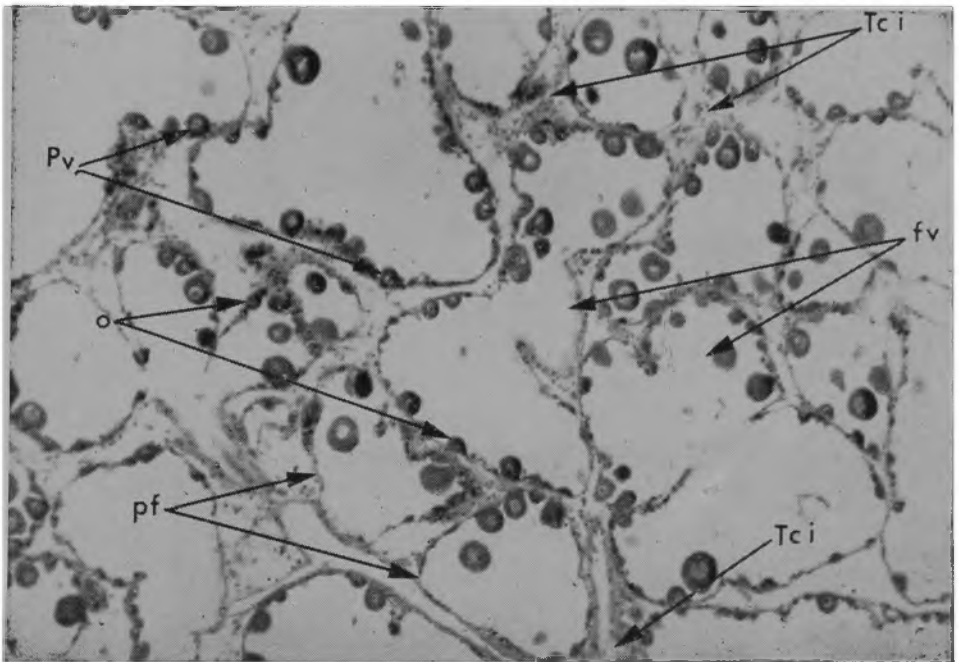


Fig. 13 — Fêmea - estágio III_B com folículos vazios de *M. perna*. pf: parede folicular; Tci: tecido conjuntivo interfolicular; fv: folículo vazio; o: oogônia; Pv: oócito em previtelogênese; em desenvolvimento. Fixação e coloração como fig. anterior. X135



Fig. 14 — Seção transversal do manto de **M. perna** macho, estágio III_{CA}, mostrando novas características de espermatogênese. cm: célula mãe dos espermatogônios; e₁, e₂: espermatogônios de 1.^a e 2.^a ordem; e1^a, e2^a: espermatócitos de 1.^a e 2.^a ordem; S: espermatátide; Sp: espermatozóides. Fixador: líquido de Navashin. Reação de Feulgen. X545

tôda uma gama, desde espermatogônios até espermatozóides, que começam apresentar uma distribuição radial convergindo para o centro do folículo (Fig. 14). Há ainda nos folículos numerosos espermatócitos, ao redor de 50%. Esta fase é confirmada ainda histologicamente pela formação de delgada película de tecido conjuntivo em tôrno dos folículos, diferenciando-a do estágio III_A.

2. **Fêmeas:** Esta fase é bem menos distinta para as fêmeas que para os machos. Um grande número de jovens oócitos recomeça o desenvolvimento (Fig. 15); raras oogônias na periferia do folículo. Os oócitos que crescem recomeçam a se comprimir e apresentam aspecto polygonal tendo passado evidentemente pelas fases de previtelogênese e vitelogênese.

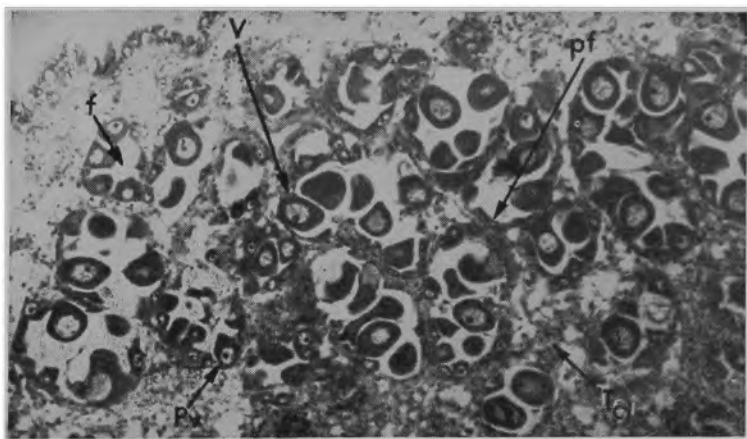


Fig. 15 — Seção transversal do manto de *M. perna* fêmea, estágio III_{CA1}, mostrando novas características de oogênese. f: folículo; pf: parede folicular; Pv: oócito em previtelogênese; V: oócito em vitelogênese; Tci: tecido conjuntivo interfolicular em desenvolvimento. Fixador: líquido de Gendre, reação ao P.A.S. X135.

Os espaços inter-foliculares começam a ser preenchidos pelo tecido conjuntivo, que inicia o seu desenvolvimento após estágio III_B.

f) Estádio D

A gametogênese termina; os folículos são vazios encontrando-se esparsos e compactados pelo tecido conjuntivo (Fig. 16) que se desenvolveu no espaço anteriormente ocupado pelos folículos repletos de gametas. Pode-se observar ainda algumas lacunas foliculares no interior do tecido conjuntivo, às quais possuem gametas residuais que serão fagocitados pelos elementos sanguíneos (Fig. 16) que também abundam nessas lacunas.

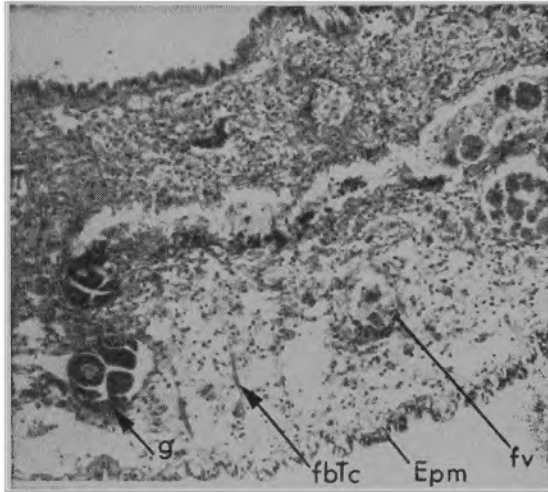


Fig. 16 — **M. perna.** Fêmea - estágio D, com folículos vazios e tecido conjuntivo em desenvolvimento. Epm: epitélio ciliado do manto; fv: folículo vazio; o: oogônia; fbTc: fibras do tecido conjuntivo. Fixador líquido de Gendre, reação ao P. A. S. X 345

g) Estádio O

O tecido conjuntivo é muito desenvolvido e os folículos das gônadas quase desapareceram completamente. Ao longo das paredes foliculares há apenas algumas «células-mães» das gônias, responsáveis pelos fenômenos posteriores de reconstituição das gônadas após a fase de repouso sexual.

ANÁLISE DA FREQUÊNCIA DOS DIFERENTES ESTÁDIOS

Para a determinação da frequência dos diferentes estádios, examinaram-se cada 15 dias, vários indivíduos de uma mesma população. Macroscopicamente é possível conhecer os estádios diferentes, já indicados no capítulo anterior p. 25) e, assim separar os animais de acôrdo com as características de cada estágio.

Simultâneamente, cada 15 dias fizeram-se cortes do manto de cêrca de 100 machos e 100 fêmeas para estudos histológicos para confirmação das observações macroscópicas. O número de animais examinados no período de novembro de 1963 a dezembro de 1964 foi de cêrca de 2.800 machos e 2.800 fêmeas.

Devo esclarecer que no número de animais examinados cada 15 dias, levei em conta também os exemplares que se achavam com as gônadas vazias (estádio III_B), os quais entram no cálculo da percentagem.

Os resultados destas análises encontram-se nas Tabelas I e II.

Ciclo anual, durante os anos 1963-1964

Os estudos histoquímicos foram limitados ao ano de 1964, mas o exame histológico do manto abrangeu também o de 1963. Os resultados obtidos foram praticamente os mesmos nos dois anos. Os elementos fundamentais no que se refere às gônadas e ao tecido conjuntivo do manto acham-se expressos nas Tabelas I e II e nos gráficos (Fig. 17, 18, 19, 20 e 21).

Darei, sumariamente, as principais características correspondentes a cada mês.

TABELA I

**PERCENTAGEM DOS DIFERENTES ESTÁDIOS SEXUAIS
EM M. PERNA**

| Datas | Estádios sexuais dos Machos | | | | | |
|---------|-----------------------------|------------------|------------------|-------------------|------|--|
| 1964 | III _A | III _B | III _C | III _{CA} | D-O | |
| 15-I | 63 | 18* | 10** | 4.5 | 4.5 | |
| 28-I | 63 | 13.5 | 10 | | 13.5 | |
| 3-II | 27 | 36 | 10 | 22.5 | 4.5 | |
| 15-II | 67.5 | 11.7 | 10 | 4.5 | 6.3 | |
| 7-III | 66.2 | 12.6 | 10 | | 11.2 | |
| 26-III | 35.2 | 3.6 | 10 | 5.0 | 46.2 | |
| 2-IV | 26.5 | 1 | 50 | 1 | 21.5 | |
| 26-IV | 5.3 | 13.3 | 60 | 21 | 0.4 | |
| 2-V | 3.0 | 1.5 | 40 | 12 | 41 | |
| 29-V | 22.2 | | 30 | 10 | 37.8 | |
| 15-VI | 22 | 8 | 55 | 5 | 10 | |
| 30-VI | 37.6 | 13.2 | 20 | 11.6 | 17.6 | |
| 14-VII | 7 | 12 | | 46 | 35 | |
| 27-VII | 59.5 | 8.5 | 15 | | 4.2 | |
| 14-VIII | 63.2 | 5.6 | 20 | | 11.2 | |
| 31-VIII | 68.6 | 9.4 | 22 | | | |
| 1-IX | 44 | 7.7 | 22 | | 26.3 | |
| 15-IX | 16.9 | 13.1 | 70 | | | |
| 2-X | 54.6 | 21.6 | 10 | 9 | 4.5 | |
| 15-X | 44.9 | 41.1 | 8 | 6 | | |
| 1-XI | 29.7 | 12.5 | 10 | 37 | 9.9 | |
| 16-XI | 36.1 | | 8 | 10.8 | 45.1 | |
| 1-XII | 53.0 | 11.6 | 7.0 | 13.0 | 14.0 | |
| 15-XII | 46.2 | 20.4 | 6.0 | 20.9 | 5.0 | |

* Percentagem de estádios microscópicos parcialmente vazios.

** Percentagem de estádios macroscópicos totalmente vazios

TABELA II

**PERCENTAGEM DOS DIFERENTES ESTÁDIOS SEXUAIS
EM M. PERNA**

| Datas | Estádios Sexuais das Fêmeas | | | | | |
|---------|-----------------------------|------------------|------|------------------|-------------------|-----|
| 1964 | III _A | III _B | | III _C | III _{CA} | D-O |
| 15-I | 63 | 10.5* | 10** | 14.7 | 1.8 | |
| 28-I | 36 | 18 | 10 | | 36 | |
| 3-II | 40.5 | 27 | 10 | 13.5 | 9 | |
| 15-II | 53.9 | 20.7 | 10 | 0.9 | 14.5 | |
| 7-III | 63.8 | 16.2 | 10 | 10 | | |
| 26-III | 44.5 | 16.5 | 10 | 5.4 | 23.6 | |
| 2-IV | 25.5 | 1 | 50 | 0.5 | 23 | |
| 26-IV | 9 | 14 | 60 | 16.5 | 0.5 | |
| 2-V | 2 | 5.5 | 46 | 24 | 22.5 | 3 |
| 29-V | 34.2 | | 30 | 10 | 25.8 | |
| 15-VI | 22 | 6 | 60 | 0.4 | 11.6 | |
| 30-VI | 25.6 | 30.4 | 20 | 15.2 | 8.8 | |
| 14-VII | 25 | 27 | | 26 | 22 | |
| 27-VII | 56.1 | 20.4 | 8.5 | | | |
| 14-VIII | 53.6 | 19.2 | 20 | | 7.2 | |
| 31-VIII | 63 | 15 | 22 | | | |
| 1-IX | 36.8 | 15.7 | 22 | | 25.5 | |
| 15-IX | 21 | 9 | 70 | | | |
| 2-X | 45 | 24.3 | 10 | 12.6 | 8.1 | |
| 15-X | 42 | 40 | 8 | 10 | | |
| 1-XI | 9 | 27 | 10 | 40.5 | 4.5 | 9 |
| 16-XI | 29 | 7.2 | 8 | 10.8 | 41.5 | 3.5 |
| 1-XII | 57.0 | 19 | 8 | 14.0 | 1.0 | 1.0 |
| 15-XII | 40.7 | 29.2 | 6 | 17.9 | 4.2 | 2.0 |

* Percentagem de estádios microscópicos parcialmente vazios

** Percentagem de estádios macroscópicos totalmente vazios

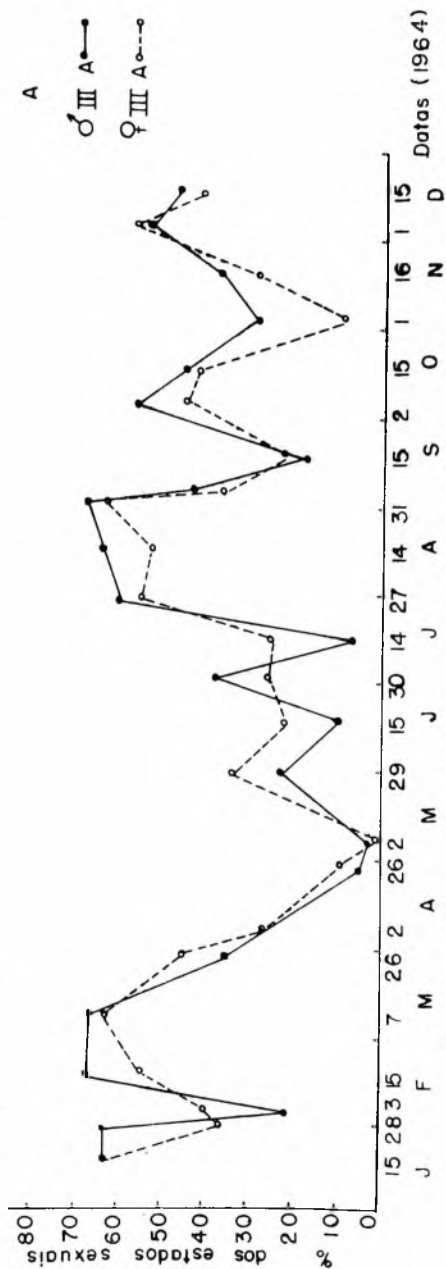
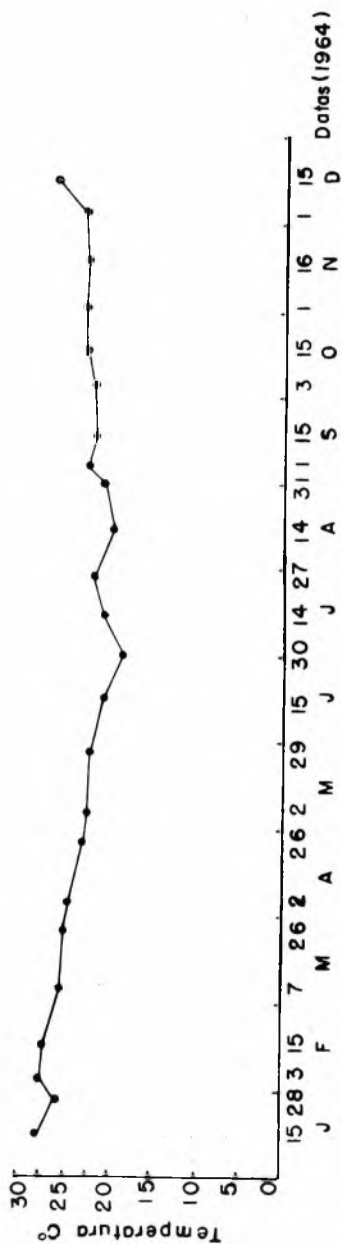


Fig. 17 — Gráfico mostrando as percentagens de *Mytilus* no estágio IIIA₁

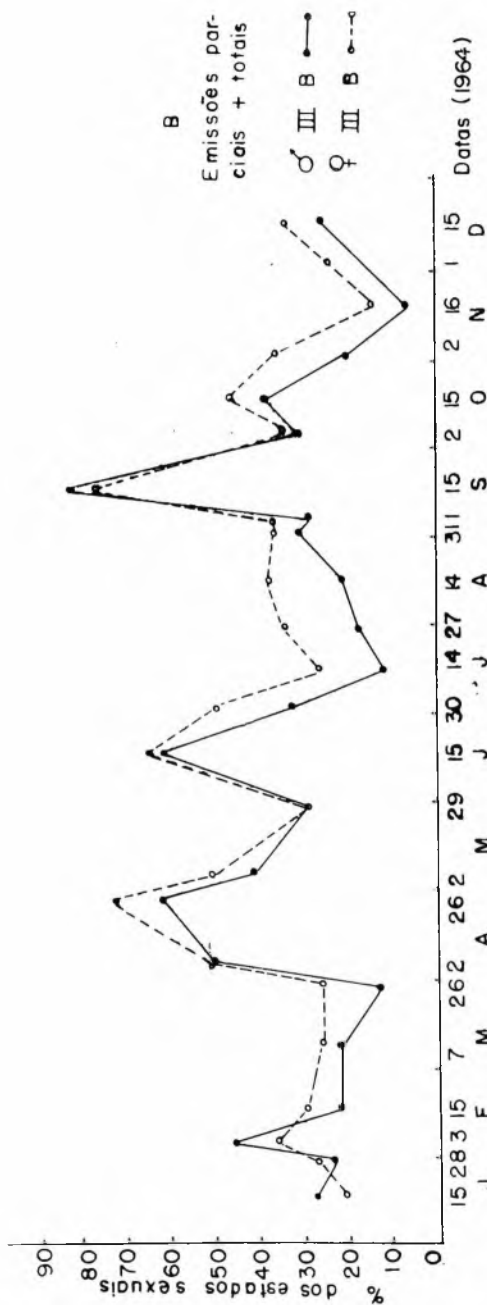
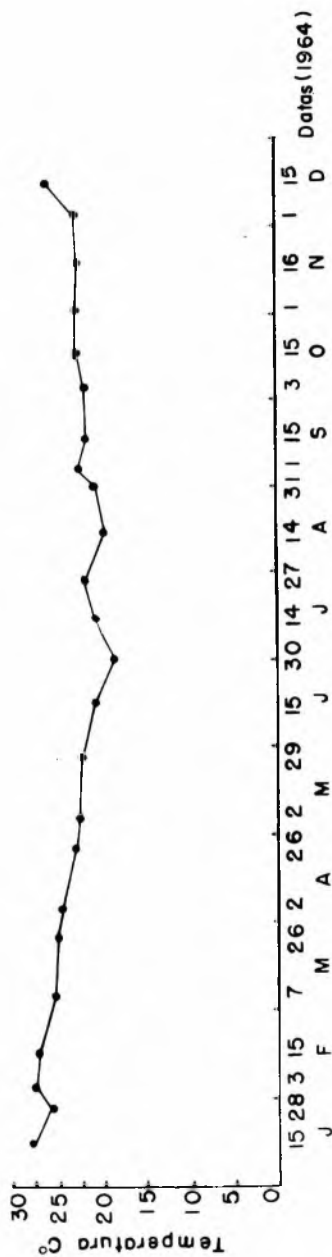


Fig. 18 — Gráfico mostrando as percentagens de *Mytilus* no estágio III_B; emissões totais e parciais.

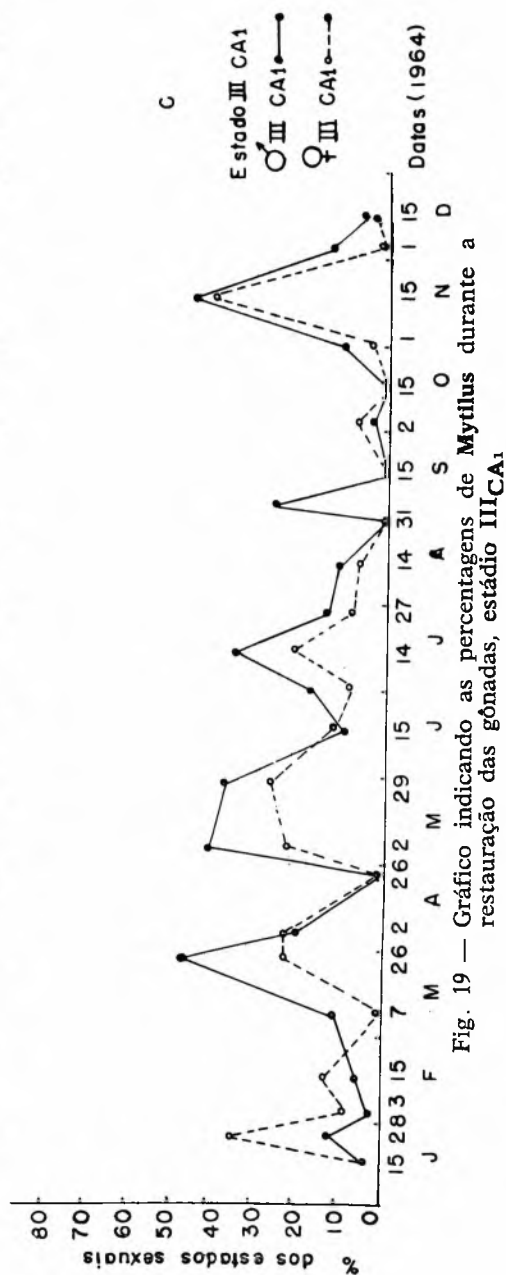
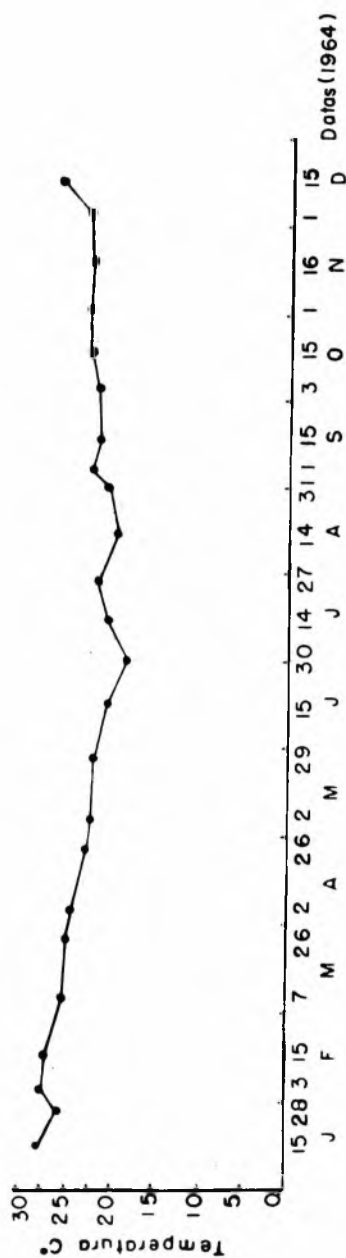


Fig. 19 — Gráfico indicando as percentagens de *Mytilus* durante a restauração das gónadas, estágio III_{CA1}.

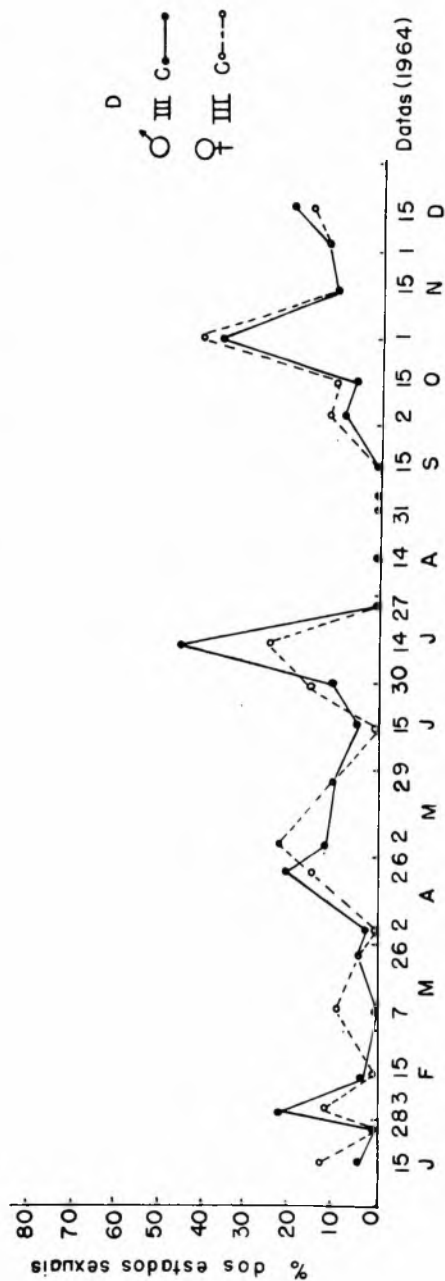
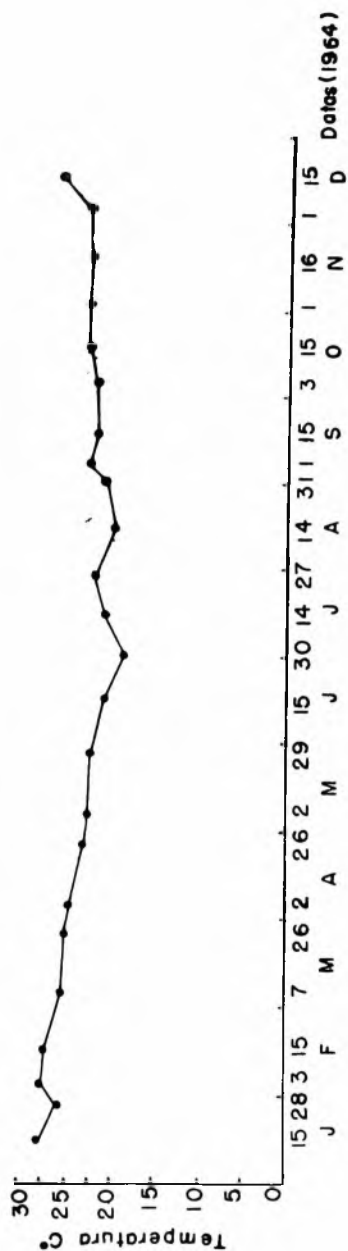


Fig. 20 — Gráfico indicando as percentagens de *Mytilus* na fase III_C

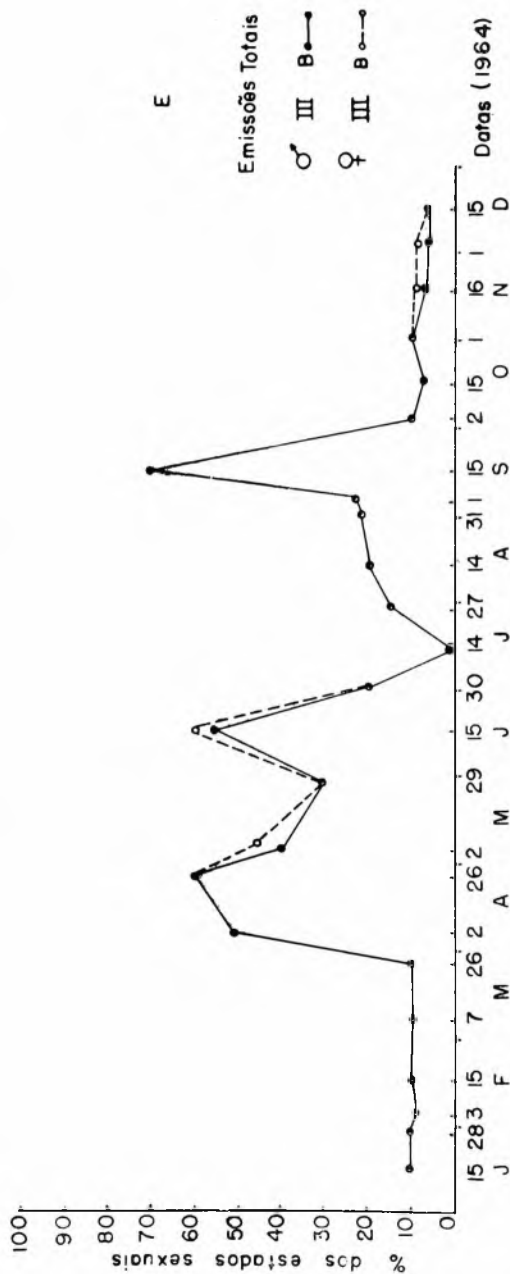
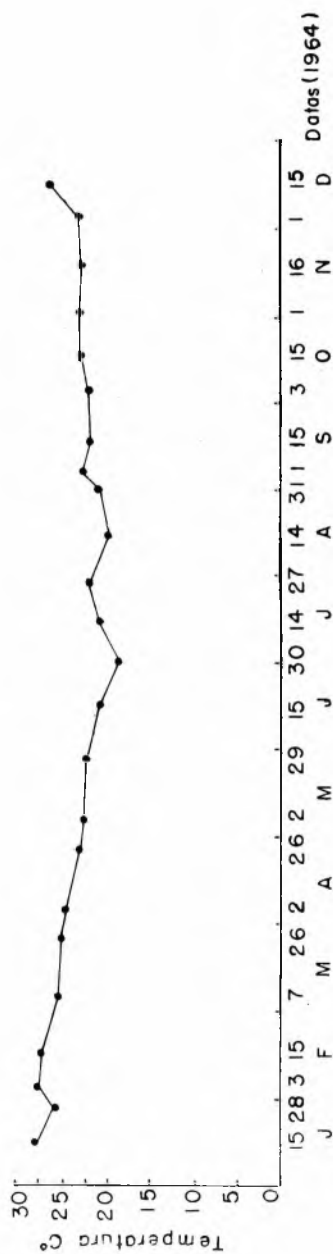


Fig. 21 — Gráfico com as percentagens dos *Mytilus* completamente vazios, estágio III_B.

Janeiro

Tecido conjuntivo interfolicular bastante desenvolvido, mais rico em lípideos e em glicogênio que no mês de dezembro. Distingue-se pela gametogênese intensa, sendo que para os machos 63% da população apresenta-se no estágio III_A; enquanto para as fêmeas essa percentagem é mantida na primeira quinzena e na segunda reduz-se quase à metade. Um pequeno número de animais, 23 a 28% de machos e fêmeas, elimina seus gametas, parcial ou totalmente. A percentagem de animais nos estádios III_C e III_{CA₁} são baixas na primeira quinzena aumentando para ambos os sexos na segunda, 13,5% para os machos e 36% para as fêmeas.

Fevereiro

Na primeira quinzena verificou-se 27% de machos e 40,5% de fêmeas no estágio III_A. Essas cifras aumentam respectivamente para 67,5 e 53,9% na segunda quinzena. A eliminação de gametas (estádio III_B) total ou parcial, oscila de 23% a 46% para os machos enquanto que para as fêmeas varia de 37 a 30%. A restauração das gônadas (estádio III_C e III_{CA₁}) é de 27% na primeira quinzena para os machos e 22,5% para as fêmeas caindo para 10,8% e 15,4% respectivamente na segunda quinzena.

Março

Período de elevado número de indivíduos no estágio III_A (67,5% de machos e 63,8% de fêmeas) na primeira quinzena, 35,2% e 44,5% respectivamente, na segunda. As emissões totais ou parciais (estádio III_B) oscilam entre 21,7% e 22,6% nos machos enquanto que nas fêmeas mantem-se na base de 26%. O estágio III_{CA₁} é muito mais evidente neste mês nos machos que nas fêmeas, 11,2% na primeira quinzena e 36,2% na segunda para os machos, enquanto para as fêmeas vai de 0% a 23,6% nesta mesma época;

essas discrepâncias talvez sejam devidas ao fenômeno da lise, já citado anteriormente (p. 20) a qual se mostra bem acentuada nesta época. Tudo se passa como se as fêmeas, tendo chegado à maturidade sexual, não eliminam os seus produtos sexuais, mas utilizam êsses elementos para liberar a energia necessária para uma nova gametogênese e um nova acumulação do glicogênio no tecido conjuntivo vesiculoso. Como já disse, esta hipótese ainda necessita de confirmação com novos dados.

A b r i l

Eliminação muito intensa de gametas (estádio III_B); primeira quinzena 50% dos animais estão com o manto completamente vazio, elevando a percentagem para 60% na segunda quinzena. Nos animais com o manto praticamente vazio, raros são os oócitos ou espermatozóides remanescentes. Para os machos, cêrca de 26,5% na primeira quinzena e 5,3% na segunda, estão num período de gametogênese inicial (estádio III_A) enquanto que para as fêmeas estas cifras são de 25,5% e 9%.

Prossegue a restauração do folículo com maior intensidade na primeira quinzena, 21,5% nos machos e 23% nas fêmeas, enquanto que no segundo período, caem êsses números para 0,4% e 0,5% respectivamente.

M a i o

Pequeno número de animais em gametogênese inicial (III_A) 30% para os machos e 2% para as fêmeas na primeira quinzena. Grande número de animais neste período está com o manto completamente vazio, cêrca de 40 a 46% para os machos e fêmeas respectivamente, enquanto que a taxa de restauração da gônada (estádio III_{CA1}) é de 41 e 22,5%.

As modificações no segundo período são devidas ao aumento do número de animais machos e fêmeas no estágio III_A, respectivamente 22,2 e 34,2%, diminuindo para ambos os sexos o número de animais que eliminou totalmente os ga-

metas cerca de 30%, enquanto que 37,8% e 25,8% estão no estágio III_{CA}.

J u n h o

Continuam as emissões de gametas, estágio III_B, na proporção de 55 a 60% para os machos e fêmeas, sendo que a gametogênese inicial III_A é de cerca de 22% para ambos os sexos, e a restauração das gônadas oscila entre 10 e 11,6%, dados estes para o primeiro período do mês.

Na segunda quinzena, há uma redução considerável no número de animais que emitiu totalmente os produtos sexuais, 20% para ambos os sexos, comparativamente com o primeiro período.

J u l h o

Na primeira quinzena baixa é a percentagem de machos no estágio III_A, cerca de 7%, sendo este número pouco mais elevado nas fêmeas, 25%. Pequena é a percentagem de animais que elimina parcialmente os gametas nesta época, 12% para os machos e 27% para as fêmeas. Com os machos nesta quinzena ocorrem principalmente fenômenos de restauração das gônadas 81%, enquanto para as fêmeas esta cifra é de 48%.

No segundo período, há um aumento considerável de animais em processo de gametogênese, estágio III_A, e redução acentuada na taxa de restauração das gônadas, 12,8% nos machos e 8,5% nas fêmeas. Há emissões total ou parcial de gametas em ambos os sexos, 15%.

Encontram-se animais machos em pequena percentagem, 4,2% no estágio D, em que o tecido conjuntivo se expande por todo o manto e os folículos são extremamente reduzidos.

A g ô s t o

Continua elevado o número de animais no estágio III_A, 63,2% e 68,6% para os machos e 53,6% e 63% para as fêmeas,

na primeira e na segunda quinzenas respectivamente. Emissões totais ou parciais continuam a verificar-se.

É uma época de baixíssima taxa de restauração da gônada sendo para os machos de 11,2% e para as fêmeas de 7,2% na primeira quinzena, inexistindo na segunda.

S e t e m b r o

Na segunda quinzena dêste mês, o fenômeno mais importante a observar é a elevada quantidade de animais que eliminou os gametas, cêrca de 70% para ambos os sexos. Inexiste neste período a restauração das gônadas.

O u t u b r o

É uma época em que ainda prevalecem os fenômenos de gametogênese, 54,9 e 44,9% para os machos e 45 e 42% para as fêmeas. As emissões parciais são mais elevadas na segunda quinzena e neste período não há fenômenos de restauração das gônadas, sendo muito baixa a cifra que indica esta ocorrência na primeira quinzena, 4,5% para os machos e 8,1% para as fêmeas.

N o v e m b r o

A gametogênese é mais intensa nos animais machos, 29,7 e 36,1% enquanto que nas fêmeas esta percentagem decresce para 9 e 29%, na primeira e na segunda quinzena respectivamente. Emissões parciais e totais ocorrem com cifras muito baixas. Nota-se neste mês elevada percentagem de animais no estágio III_C e III_{CA1}, tanto na primeira como segunda quinzenas. Baixa é a percentagem do estágio D, atingindo para as fêmeas 9 e 3,5% enquanto para os machos é de 0,9%.

D e z e m b r o

É a fase de desenvolvimento máximo de tecido conjuntivo vesiculoso e embora haja uma grande percentagem de ani-

mais em vias de intensa gametogênese de 40 a 57%, os folículos têm diâmetros mais reduzidos pois são compactados pelo tecido conjuntivo.

Em relação a todos os meses precedentes as emissões totais são as mais reduzidas, oscilando de 6 a 8% para ambos os sexos. O estágio D se faz presente porém com um número bem reduzido de indivíduos nesta fase.

Baseados nos resultados expostos nas tabelas I e II e nos gráficos (Fig. 17, 18, 19, 20 e 21) poder-se-á chegar às seguintes conclusões:

1. Há um sincronismo, se bem que ocorram algumas discrepâncias, entre as seqüências do ciclo sexual de *M. perna*, tanto nos machos como nas fêmeas. Esta coincidência dos fenômenos é evidente em todos os estádios, III_A, III_B, III_C e III_{CA}, sendo ainda mais coincidente no estágio III_B, nas emissões totais de gametas (coluna 4, Tabelas I e II).

2. Dois períodos de emissão de gametas mais importantes para os anos de 1963-64, foram verificados: no outono, abril-maio e junho (1.^a quinzena) e na primavera (setembro), sendo que nesta última a percentagem de emissão dos gametas é mais elevada que na época outonal.

3. Entre os meses precedentes ocorrem fenômenos de eliminação de gametas, o que porém não chega a afetar senão uma pequena parte da população, comparativamente aos meses anteriores.

4. Não há um período de repouso sexual definido como em *M. edulis* e *M. galloprovincialis*.

O período de repouso sexual em *M. perna* pode ocorrer em novembro ou dezembro ou ainda, algumas vezes em maio ou julho. É um período muito curto e imediatamente seguido por fenômeno de gametogênese. Não foi possível ainda determinar exatamente os limites destes períodos.

5. Não há sincronismo durante a fase de repouso sexual afetando toda a população. Apenas um pequeno número de indivíduos se encontra nesta fase, nos períodos citados anteriormente.

Resumindo, pode-se dizer que o ciclo sexual de *M. perna* é praticamente contínuo, com períodos de reprodução mais acentuados no outono (abril, maio, junho) e na primavera (setembro) e intervalos nos quais ocorrem emissões de gametas de menor importância. A atividade sexual é diminuída no verão (dezembro) e no inverno (julho). Nota-se no outono e no verão um grande desenvolvimento de tecido conjuntivo vesicular.

Estas conclusões são evidentes nos gráficos (Fig. 17 e 21) nos quais se pode verificar que nas datas em que os estádios de gametogênese intensa (III_A) são mínimos, os de eliminação de gametas são máximos. Da mesma forma pode-se observar que há uma defasagem nas percentagens que indicam esses estádios.

Nota-se ainda, pela comparação dos gráficos B e C (Fig. 18 e 19) que para as percentagens mínimas do estágio (III_B), correspondem de um modo geral, as percentagens máximas para o estágio III_{CA}1.

Entre as principais épocas de emissão dos gametas, a percentagem mais alta é atingida no mês de setembro (Fig. 21).

A expulsão de gametas de ambos os sexos é contínua e na realidade se superpõe como se pode ver no gráfico E (Fig. 21). Apenas de meados de abril a junho e de meados de outubro a dezembro as fêmeas apresentam maior percentagem na eliminação de gametos.

7.

COMPARAÇÃO ENTRE A DURAÇÃO DO CICLO SEXUAL DE *MYTILUS PERNA* E A DOS CICLOS DE OUTRAS MYTILIDAE

Pareceu-me de interesse comparar o ciclo sexual de *M. perna* com o de *M. edulis* e o de *M. galloprovincialis* e de *M. californianus*, tendo em conta os resultados obtidos por diferentes autores.

a) *M. edulis* — A duração do ciclo sexual nêste Bivalvo é tanto mais longa quanto mais se situam as populações em regiões mais quentes na área de distribuição. Na Holanda, p. ex., a duração da fase de repouso sexual vai de outubro a março, e reduz-se na Mancha-Francêsa e em Arcachon (Atlântico) onde Lubet (1.c. p. 53-83) anotou que a duração do estágio O se estende do fim de maio a fim de setembro. Nesta última região, onde a temperatura no inverno é cêrca de 4° C e no verão 20° C o período de maturação sexual, incluindo a época de restauração das gônadas, vai do fim de dezembro ao fim ou comêço de junho.

b) *M. galloprovincialis* — Boucart e Lubet (1964, p. 1) verificaram que, no Mediterrâneo (Toulon), a fase de repouso sexual nesta Mytilidae ocorre em julho e no início de agosto. Os fenômenos da gametogênese reiniciam a partir dêste último mês pelos estádios I e II. A maturação sexual, estágio III, é atingida no mês de setembro, sendo que o tecido conjuntivo interfolicular fica ainda bem desenvolvido até dezembro.

Eliminações importantes de gametas ocorrem no fim de setembro e outubro, sendo mais importantes as que se dão no outono e na primavera. O período de reprodução abrangeria do fim de setembro até maio-junho.

Em Arcachon, Lubet (1959, p. 53) mostrou que na região de Eyrac, o estágio O (repouso sexual) vai sômente do início de julho ao de setembro.

Renzoni (1962, p. 40, 41) anotou na região de Siracusa (Itália) que em janeiro e fevereiro êstes mexilhões entram em repouso sexual quase absoluto. Apresentam gametas maduros, prontos para serem eliminados nos meses de abril e maio e de outubro e novembro.

c) *M. californianus* — Segundo Young (1942, p. 490-492) as emissões dos gametas, ou melhor, a percentagem de animais que expulsam gametas em um lote de mexilhões, começa em setembro e gradualmente aumenta até atingir o máximo em meados do inverno (janeiro) e, então gradativamente declina para um mínimo nos meses de maio até agosto. Ocasional-

mente podem expulsar gametas no verão, mas, este fenômeno se dá apenas numa baixa percentagem da população.

Êstes dados são opostos aos mencionados por Coe e Fox (1942, p. 23) nas costas meridionais da California, região em que os mexilhões expõem os gametas em qualquer estação do ano, porém, mais intensamente na primavera e no outono e mínima na metade do inverno e do verão. Os referidos autores não fazem referência a uma ausência completa dos fenômenos sexuais que afetem em parte ou totalmente a população estudada.

d) *M. perna* — Como foi dito, as regiões habitadas por este mexilhão caracterizam-se por uma permanente temperatura relativamente elevada, sem os limites nítidos entre as estações, se comparada com as outras regiões onde ocorrem os mexilhões acima citados. Porisso, neste estudo procurarei relacionar os fenômenos observados com as temperaturas locais.

Como se viu, o ciclo sexual de *M. perna* mostra períodos de menor atividade na expulsão de gametas no verão (janeiro, fevereiro e março), período em que a temperatura oscila de 3,5°C (máxima de 28°,5 e mínima de 25°C) e no inverno, variando de 4°C (máximo de 23° e mínima de 19°C). A cessação dos fenômenos sexuais não se observa senão em pequeno número de indivíduos, e esta parada pode dar-se, como foi visto, em momentos diversos da vida dos animais. Encontramo-la principalmente em novembro e dezembro, mas também em maio e julho após intensa expulsão de gametas.

As principais emissões ocorreram quando a temperatura estava ao redor de 22,5° C o que não quer dizer que esta seja a temperatura ótima para a produção do fenômeno, uma vez que para essa mesma temperatura há épocas de fraquíssimas emissões de células reprodutoras (Fig. 21).

O único mês em que não se assinalou a emissão de gametas foi julho, quando a temperatura da água atingiu a temperatura mínima de 19°C, no início do mês.

Deve-se notar que nas águas tropicais, a temperatura é mais estável e elevada oscilando de apenas 9°C durante o ano

de 1963, entre a máxima e a mínima nos períodos de janeiro a junho.

Na falta de melhores informações sobre o ciclo sexual dos mexilhões relacionados com a variação da temperatura, valime dos dados sobre as Ostras, que é um Bivalvo que em geral ocorre nas mesmas regiões das Mytilidae. Assim Galtsoff (1964, p. 407) mostrou que as variações de temperatura afetam a vida da ostra, interferindo no controle da taxa de transporte de água filtrada, na alimentação, respiração, formação das gônadas e na eliminação dos gametas.

Trabalhos realizados por Loosanof (1945, pp. 124 e 155) com ostras retiradas do ambiente onde a temperatura da água estava próxima do ponto de congelação e com as gônadas inativas, transportadas para água a 20°C, e conservadas nesta temperatura por 20 dias, mostraram que alguns animais produzem um grande número de ovos e espermatozóides neste período. Não obstante a maioria das ostras continuar imaturas, após trinta dias, no entretanto, os animais se achavam em condições muito mais adiantadas e muitos indivíduos já possuíam um número bem elevado de ovos ou espermatozóides ativos.

Segundo Renzoni (1962, p. 43) a deposição de gametas pelos mexilhões da região de Nápoles, coincide com o aumento da temperatura do fim do inverno e início da primavera (15° e 16°C) e se repete, se bem que em quantidades inferiores, quando a temperatura da água começa a baixar depois da elevada temperatura estival, que vai de 18 a 20°C. A libertação das células sexuais muitas vezes requer um estímulo que desencadeie a emissão de gametas. Este fenômeno frequentemente está associado à repentina elevação da temperatura da água.

Desta forma, a ausência de variações térmicas importantes e as temperaturas mais elevadas poderiam explicar a continuidade dos fenômenos de reprodução em *M. perna*.

A falta de uma fase de repouso sexual afetando toda a população em *M. perna* não significa que o ciclo sexual tenha uma intensidade uniforme durante todo o ano.

De acordo com os trabalhos realizados pelos autores precedentes poder-se-ia concluir que a continuidade dos fenôme-

nos sexuais em *M. perna* nas regiões estudadas se deve à ausência de oscilações intensas da temperatura que, como se viu, no ano de 1963, foram no máximo de 9°C. Embora em muitos aspectos haja diferenças do ciclo sexual de *M. perna* com os de outras Mytilidae não há dúvida de que naquele Bivalvo existe uma periodicidade dos fenômenos da reprodução, a qual se dá no outono e na primavera.

8.

O TECIDO CONJUNTIVO INTERFOLICULAR

a) *Introdução*

O tecido conjuntivo sofre uma série de modificações no aspecto e nas reservas que as suas células apresentam durante as diversas etapas do ciclo sexual. Assim, Bargeton (1941, p. 121) assinala em *Gryphaea angulata* que a atividade genital se traduz por variações estacionais do teor de glicogênio do tecido conjuntivo, o qual, com a proliferação e desenvolvimento das gônadas, tende a regredir.

Em *M. galloprovincialis* Renzoni (1961, p. 49) indica que na segunda quinzena de outubro, novembro e dezembro, só raramente encontrou aspectos histológicos mostrando fenômenos de maturação sexual; na maior parte dos indivíduos examinados, o manto é delgado e constituído neste período de tecido conjuntivo vesiculoso. Após essa fase, assiste-se a um evidente espessamento do manto, devido à enorme expansão, do tecido germinativo. Afirma ainda o mesmo autor (1961, p. 13) que nesse período a quantidade de glicogênio pode apresentar aspectos diversos. Em alguns animais as células conjuntivas são providas desta substância, enquanto em outros ela é totalmente ausente.

Em *M. edulis* Lubet (1959, p. 60) assinala também uma relação entre a menor atividade das células reprodutoras e a maior proliferação do tecido conjuntivo que acumula reservas como lípideos e glicogênio.

Nas minhas investigações em *M. perna* pude verificar vários aspectos do tecido conjuntivo, que passarei a relatar em seguida, tendo utilizado as seguintes técnicas:

Fragmentos de 0,5 a 1 cm do manto foram fixados em Gendre, Bouin-Hollande e Navashim. Após inclusão em parafina as preparações de 4 a 6 μ foram coradas com hematoxilina-eosina e com tricrômico de Masson.

As células conjuntivas de *M. perna* possuem núcleo excêntrico e cromatina muito compacta, apresentando 4 a 5 μ de diâmetro máximo. Deve-se notar que estas células vesiculosas podem encerrar simultaneamente glucídeos redutores, glicogênio, e lípideos neutros e fosfolípideos.

Pode-se dizer então que a natureza dêste tecido diferencia *M. perna* de *M. edulis* e de *M. galloprovincialis*. Nestas duas últimas espécies, sabe-se (Lubet 1959, p. 32; Renzoni 1960, p. 10) que o tecido conjuntivo interfolicular é formado de células vesiculosas de dois tipos fundamentais, adipo-granulosas que acumulam os lípideos e o glicogênio e vesículas de Langer ou de Leydig que acumulam somente glicogênio. Em *M. perna* o tecido conjuntivo interfolicular é formado apenas de células vesiculosas que contêm ao mesmo tempo glicogênio e lípideos.

Este tecido, mesmo no animal adulto, está em contínua renovação, pois desaparece no estado de repleção das gônadas e reaparece em várias etapas do ciclo sexual.

Admite-se que o tecido conjuntivo de algumas bivalvos tenha origem em certos elementos figurados do sangue.

Nos Lamelibrânquios os referidos elementos figurados devido ao seu modo de deslocamento e capacidade de modificação da forma, são chamados amebócitos (Cuénot 1891, p. 49). Pertencem aos leucócitos e podem classificar-se em grupos distintos (Takatsuki 1934, p. 381) porém, seu centro de formação e fases de diferenciação são ainda muito mal conhecidos.

Em *M. galloprovincialis* — Dö (1964, p. 2104) analisou amostras de sangue e notou que esta espécie possui somente amebócitos, sem se referir sobre o local da leucopoiese.

Em culturas de tecidos de *Modiolus modiolus* Gresson (1937, p. 659 e 678) demonstrou a ocorrência de amebócitos sempre circundando a margem seccionada do manto algumas horas após a realização das culturas, sem mencionar, no entanto, onde êsses elementos seriam produzidos.

Tendo em vista os resultados histológicos, realizei posteriormente exames de amostras de sangue de *M. perna* com o intuito de verificar os tipos de células sanguíneas existentes nestes animais. Confirmaram-se assim, os resultados obtidos histologicamente. Em *M. perna* também há somente uma categoria de leucócitos que possuem grânulos no interior do citoplasma, sendo chamados devido a isto de leucócitos granulosos.

b) *Origem do tecido conjuntivo*

Os primeiros estados de desenvolvimento do tecido conjuntivo aparecem sempre entre os folículos e o epitélio do manto (Fig. 22). Antes dêste aparecimento, nota-se sempre a presença de um grande número de elementos de origem sanguínea que podem ser classificados na categoria de leucócitos granulosos ou granulócitos (Fig. 23). Observa-se uma multiplicação destas células nesta zona do manto e daí migram, pelo que deduzo ser a mesma um importante centro de leucopoise.

Emprêgo de técnicas adequadas entre as quais a dos radiosótopos, poderia vir a confirmar essa assertiva, bem como esclarecer outros fatos da formação de tecido conjuntivo em *M. perna*.

Observações citológicas mostraram que um certo número de granulócitos se encarrega primeiramente de acumular fracas quantidades de glicogênio pois dão reação positiva ao P. A. S. e negativa após a digestão salivar. Na região próxima do núcleo, em muitos granulócitos há um vacúolo reniforme. O núcleo torna-se intensamente paquicromático (Fig. 24) e o vacúolo pode fragmentar-se, primeiramente em dois, depois

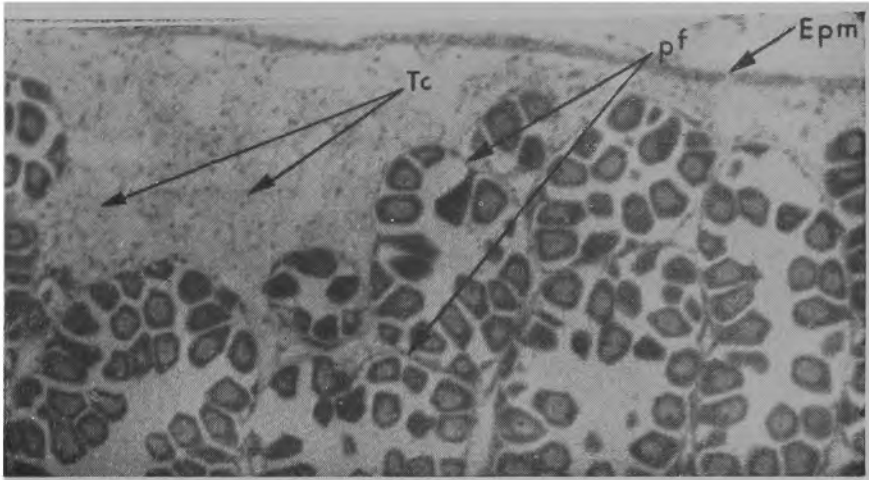


Fig. 22 — Desenvolvimento do tecido conjuntivo entre os folículos e o epitélio do manto de *M. perna*. Epm: epitélio do manto; pf: parede folicular; Tc: tecido conjuntivo. Fixador Gendre, reação ao P.A.S. X135

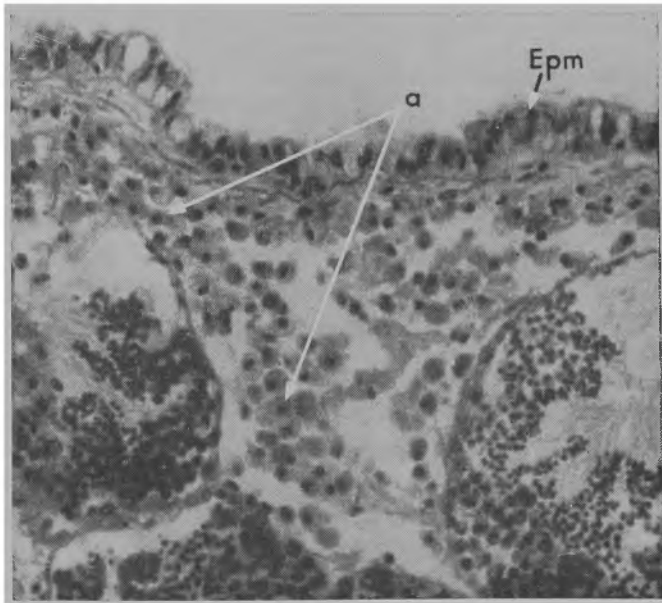


Fig. 23 — Multiplicação dos amebócitos abaixo do epitélio do manto, Epm, durante a formação do tecido conjuntivo de *M. perna*. a: amebócitos. Fixador Navashin, reação de Feulgen. X580

cada elemento em outros vacúolos que se deslocam para a periferia formando uma franja de aspecto reticulado sôbre a borda externa das células.

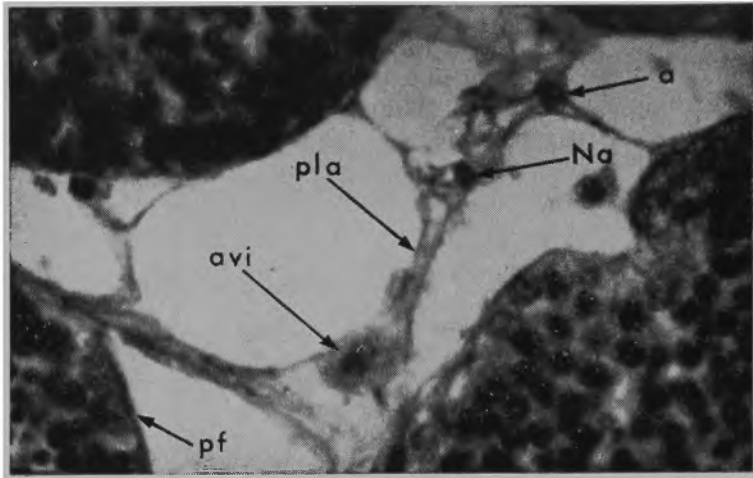


Fig. 24 — Vacuolização dos amebócitos durante a formação do tecido conjuntivo de *M. perna*. a: amebócito vacuolizado; avi: amebócito em vacuolização inicial; Na: núcleo do amebócito; pf parede folicular; pla: prolongamentos dos amebócitos. Fixador líquido de Nashin, reação de Feulgen. X870

Estas modificações, parece-me deram origem à classificação dos leucócitos dos Bivalvos em grande número de categorias (2 a 7 categorias segundo as espécies) de acôrdo com vários autores.

Na fase de vacuolização do citoplasma periférico, os amebócitos podem emitir prolongamentos, os quais se fundem com expansões de células vizinhas, formando uma rede de células vacuolizadas de núcleo excêntrico. Grãos de glicogênio, e algumas vêzes lípideos, aparecem entre êstes vacúolos, nos prolongamentos citoplasmáticos. As células vesículas do tecido conjuntivo parecem então provir da modificação dos granulócitos. Enquanto algumas destas células acumulam numa primeira fase glicogênio e posteriormente lípideos, outras

concentram substâncias que podem relacionar-se às proteínas, pois dão reação intensa com a fucsina para-aldeído; não dão reação com o P.A.S. e tão pouco se coram quando tratadas pelos diversos corantes dos lipídeos.

Difícil é estabelecer uma separação real entre êstes dois tipos, visto não ser ainda possível afirmar que ambas sejam etapas metabólicas diferentes de uma mesma categoria de células.

O glicogênio não tarda a formar aglomerados importantes e dá, além disso, artefatos em forma de gotas, após a fixação no líquido de Gendre, apresentando algumas vêzes imagem de fuga.

Em trabalhos realizados com o manto de *Helix aspersa* (Gotenby e Hill 1934, p. 343) revelou-se que as células amebóides que crescem e migram do manto seccionado formando uma rede, são idênticas aos elementos de tecido conjuntivo, e que, em cultura estas células também apresentam disposição reticular tal como no tecido conjuntivo do manto normal.

O exame de secções do manto de *Modiolus* (Gresson 1937, p. 659-678) mostra também numerosas células iguais às amebóides provenientes da cultura do manto isolado, donde se concluiu que o tecido conjuntivo do manto de *Modiolus* é feito pelos amebócitos.

Em *M. perna*, pela observação histológica quando da formação do tecido conjuntivo inter-folicular, pode-se notar que os espaços originados do esvaziamento das gônadas são preenchidos por categorias de células com aspecto e comportamento iguais às enumeradas anteriormente e que passam a constituir o tecido conjuntivo do animal que já ultrapassou o período sexual.

Embora no animal jovem, sexualmente imaturo, seja desconhecida, pelo menos até agora, a origem do conjuntivo, no adulto que já eliminou os gametas no mínimo uma vêz, êste tecido conjuntivo de néo-formação, tem origem dos leucócitos e nada difere na sua aparência e reações ao do animal jovem.

c) *Evolução do tecido conjuntivo*

Não tendo sido possível contar o número de células conjuntivas interfoliculares que contém glicogênio, a fim de obter dados comparativos entre os diversos aspectos observados, em virtude de em *M. perna*, os contornos celulares dêsse tecido não serem suficientemente distintos de modo a permitir uma perfeita individualização dos seus elementos, resolvi elaborar uma tabela referente ao desenvolvimento do mesmo tecido.

Para isto, tomei uma população de animais escolhida ao acaso, em geral com cerca de 120 a 180 indivíduos e pela análise das preparações microscópicas, verifiquei o estado de desenvolvimento do tecido conjuntivo.

Assim, denominei de *estádio O* o caracterizado pela ausência de tecido conjuntivo interfolicular (Fig. 25 e 26), *estádio*

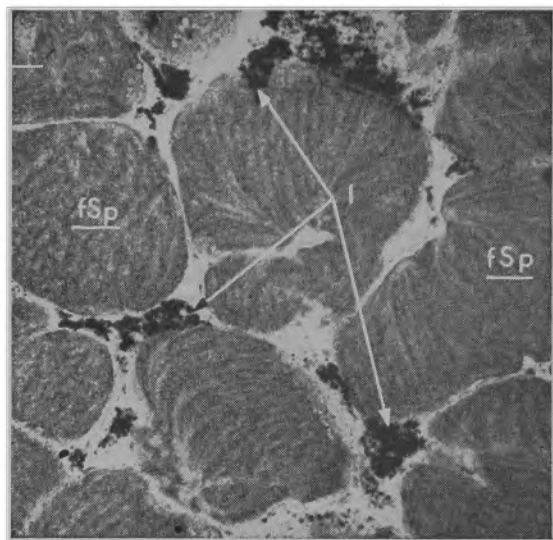


Fig. 25 — Seção transversal do manto de *M. perna*, macho, estágio III_{A1} e tecido conjuntivo estágio O. fSp: folículo com espermatozóides; l: gotículas de lipídeos no tecido conjuntivo interfolicular. Fixador: formol salino e coloração com o Sudan IV — Corte a congelação. X345.

I, quando ocorre apenas um esbôço dêste tecido ao longo e abaixo do epitélio do manto (Fig. 1); estágio *II* em que os folículos se acham parcialmente circundados pelo referido tecido (Fig. 27 e 28); *estádio III* no qual os folículos, não somente se acham circundados inteiramente pelo tecido conjun-

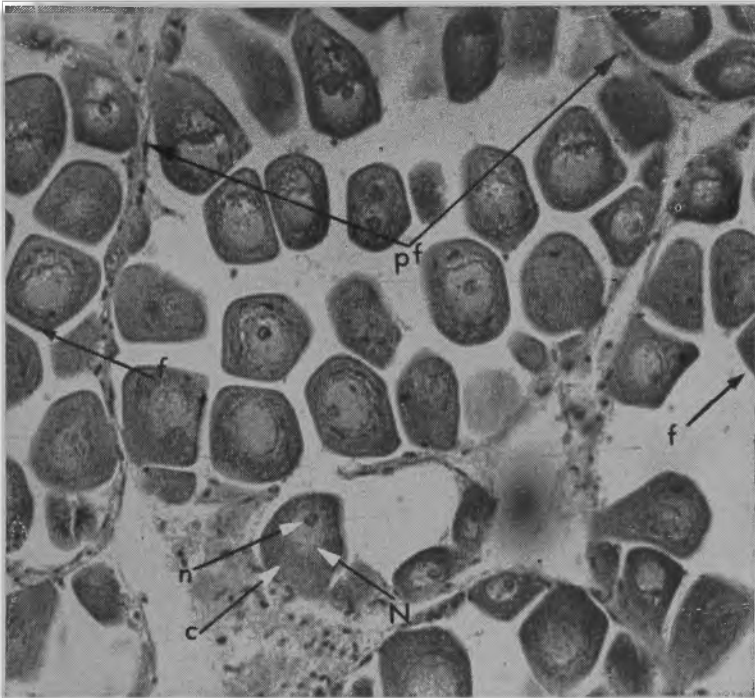


Fig. 26 — Seção transversal do manto de *M. perna* fêmea, estágio III_{A₂}, e tecido conjuntivo estágio O. f: folículos com oócitos no interior; c: citoplasma; N: núcleo; n: nucléolo; pf: parede folicular. Fixador líquido de Gendre, reação ao P.A.S. X345

tivo, como já apresentam uma certa compressão dos mesmos devido ao extraordinário desenvolvimento do tecido (Fig. 29 e 30) e, finalmente *estádio D* em que houve completa expulsão dos gametas, portanto, quase total desaparecimento dos folí-

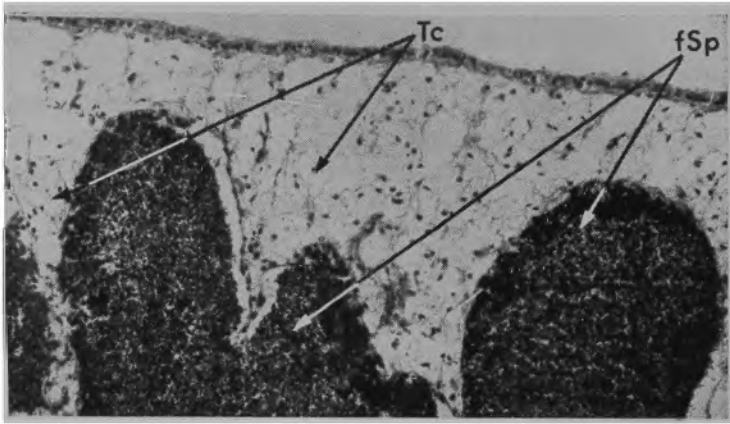


Fig. 27 — Seção transversal de *M. perna* macho, estágio IIIA₁, e tecido conjuntivo estágio II. fSp: folículo com espermatozói-de; gl: glicogênio no tecido conjuntivo interfollicular; Tc: tecido conjuntivo interfollicular. Fixador: líquido de Gendre, reação ao P.A.S. X345

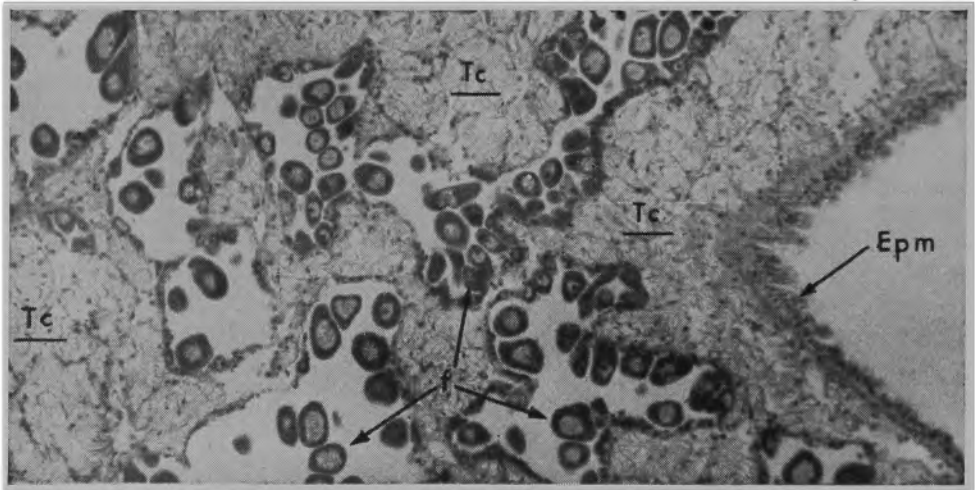


Fig. 28 — Seção do manto de *M. perna* fêmea, estágio IIIA₂, mostrando o tecido conjuntivo estágio II. Epm: epitélio do manto; Tc: tecido conjuntivo em formação invadindo os espaços interfolliculares. Fixador: líquido de Gendre, reação ao P.A.S. X545

culos, ficando, em geral, o manto provido principalmente de células vesiculosas e grande número de elementos fibrosos (Fig. 31).

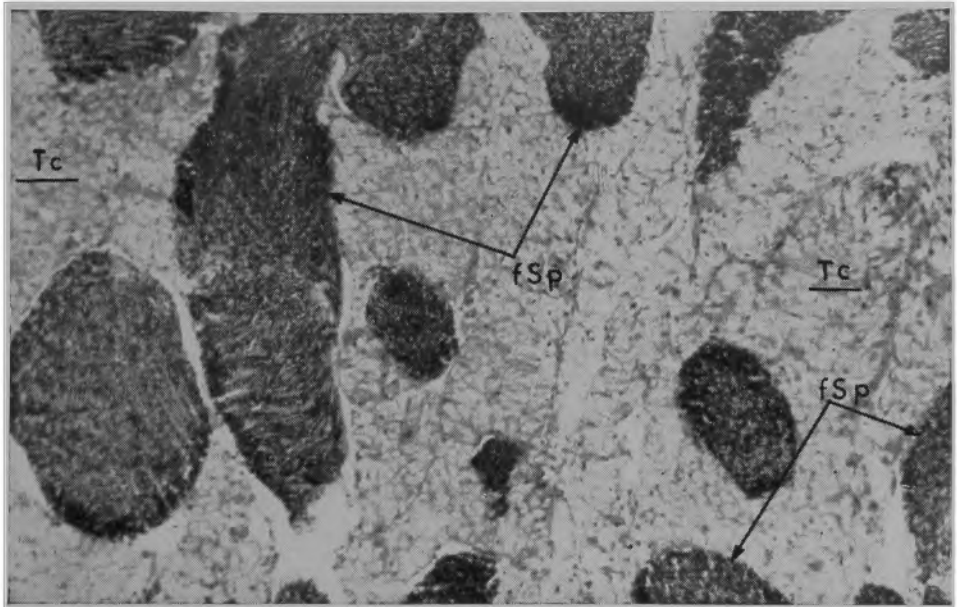


Fig. 29 — Seção transversal do manto de *M. perna* macho, estágio III_{A₂}, e tecido conjuntivo estágio III. fSp: folículo com espermatozoides; Tc: tecido conjuntivo interfolicular. Fixador líquido de Gendre, reação ao P.A.S. X135.

Com bases nesses estádios, elaborei, como disse, a Tabela III na qual relaciono percentualmente os diferentes estádios.

Como se pode notar na Tabela 3 o tecido conjuntivo em seu desenvolvimento apresenta um ciclo anual que é exatamente o inverso do ciclo sexual. O máximo de desenvolvimento é (estádio III) atingido em novembro, dezembro e janeiro, época na qual o ciclo sexual é menos intenso. Diminui progressivamente em fevereiro, porém, em março (1964) pude notar uma retomada temporária deste desenvolvimento (26-3-64). Talvez fôsse necessário relacionar este fenômeno com o fato assinala-

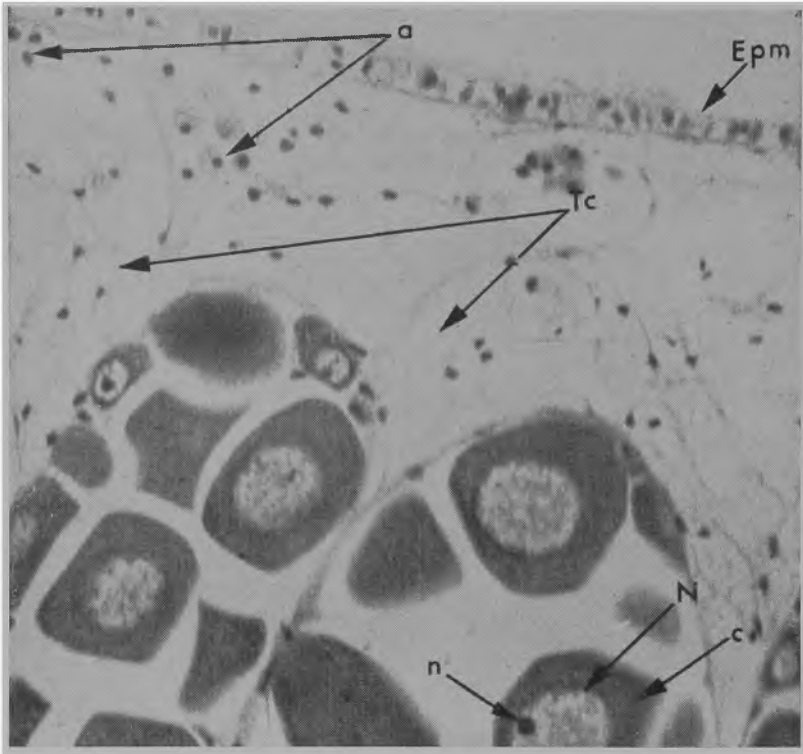


Fig. 30 — Seção transversal do manto de *M. perna* fêmea, estágio III_B, e tecido conjuntivo estágio III. f: folículos com oócitos; Epm: epitélio do manto; Tc: tecido conjuntivo interfollicular. Fixador: líquido de Gendre; reação ao P.A.S. X135.

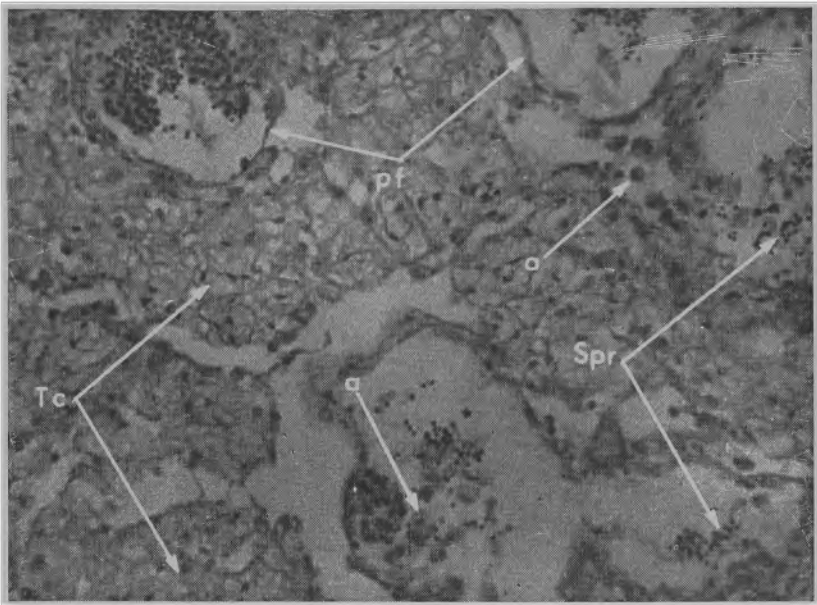


Fig. 31 — Seção transversal do manto **M. perna** macho, estágio D, tecido conjuntivo estágio III. a: amebócito no interior do folículo; pf: parede folicular; Spr: espermatozóides remanescentes. Tc: tecido conjuntivo. Fixador líquido de Gendre, reação ao P.A.S. X345

TABELA III

**PERCENTAGEM DOS ESTÁDIOS DE DESENVOLVIMENTO DO
TECIDO CONJUNTIVO DE M. PERNA DURANTE O ANO 1964**

| Datas 1964 | Machos | | | | | Fêmeas | | | | |
|-----------------------------|---------------|----------|-----------|------------|------------|---------------|----------|-----------|------------|------------|
| | Est. O | I | II | III | "D" | Est. O | I | II | III | "D" |
| 15-I | 10 | 30 | 23 | 27 | — | 8 | 40 | 23 | 29 | — |
| 28-I | 0 | 29 | 20 | 51 | — | 0 | 50 | 20 | 30 | — |
| 3-II | 12 | 30 | 38 | 20 | — | 8 | 69 | 18 | 10 | — |
| 15-II | 17 | 44 | 26 | 13 | — | 6 | 60 | 20 | 14 | — |
| 7-III | 54 | 38 | 7 | 1 | — | 59 | 35 | 5 | 1 | — |
| 26-III | 7 | 50 | 41 | 2 | — | 18 | 40 | 30 | 12 | — |
| 2-IV | 59 | 35 | 5 | 1 | — | 65 | 29 | 5 | 1 | — |
| 26-IV | 74 | 24 | 1 | 1 | — | 74 | 24 | 2 | — | — |
| 2-V | 82 | 10 | 2 | — | 6 | 72 | 15 | 3 | — | 10 |
| 29-V | 95 | 4 | 1 | — | — | 85 | 15 | — | — | — |
| 15-VI | 94 | 6 | — | — | — | 98 | 2 | — | — | — |
| 30-VI | 98 | 2 | — | — | — | 100 | — | — | — | — |
| 14-VII | 99 | 1 | — | — | — | 100 | — | — | — | — |
| 27-VII | 100 | — | — | — | — | 92 | 8 | — | — | — |
| 14-VIII | 98 | 2 | — | — | — | 95 | 5 | — | — | — |
| 27-VIII | 88 | 2 | 1 | — | — | 91 | 8 | 1 | — | — |
| 1-IX | 36 | 40 | 14 | 10 | — | 26 | 34 | 20 | 20 | — |
| 15-IX | 30 | 36 | 18 | 16 | — | 36 | 34 | 12 | 18 | — |
| 2-X | 40 | 39 | 13 | 8 | — | 40 | 26 | 23 | 11 | — |
| 15-X | 45 | 35 | 10 | 10 | — | 35 | 38 | 12 | 15 | — |
| 1-XI | 18 | 22 | 42 | 18 | — | 30 | 25 | 15 | 20 | — |
| 16-XI | 16 | 28 | 34 | 22 | — | 31 | 28 | 21 | 20 | — |
| 1-XII | 15 | 25 | 30 | 30 | — | 15 | 38 | 32 | 15 | — |
| 15-XII | 10 | 30 | 35 | 25 | — | 18 | 27 | 30 | 25 | — |

do anteriormente, de que numerosos oócitos, nesta época, estão em vias de lise e liberariam metabólitos para a restauração do tecido conjuntivo, e de certas reservas, como por exemplo o glicogênio.

A partir do mês de abril a redução do tecido conjuntivo é considerável devido ao grande desenvolvimento dos folículos do manto. Esse tecido é completamente ausente após intensa emissão de gametas no fim de abril ou princípio de maio. Não o encontrei mais até o mês de agosto. A partir desta época os animais começam a prover-se de tecido conjuntivo, o qual reaparece nas condições que foram indicadas no parágrafo anterior, sob o epitélio do manto (estádio I).

Durante as diversas etapas do ciclo sexual de *M. perna*, o tecido conjuntivo, além das modificações descritas acima apresenta outras referentes às reservas glucídicas.

Utilizando métodos histoquímicos, pude acompanhar a localização dos lípideos e do glicogênio durante as fases do ciclo reprodutivo, tentando precisar, na medida do possível, a natureza provável dos diferentes constituintes lipídicos.

Em *Gryphaea angulata*, Bargeton (1941, p. 121) assinala variações do teor de glicogênio nos tecidos da ostra, quando a atividade genital determina uma regressão do tecido conjuntivo vesiculoso, o que explica a diminuição da quantidade de glicogênio.

Meenakshi (1956, p. 62) conclui que o glicogênio é a principal fonte de energia na atividade reprodutiva de *Pila virens*.

Como se vê, admite-se a existência de uma íntima relação entre o desenvolvimento do tecido conjuntivo, e o teor do glicogênio.

À vista disto, julguei de interesse tratar agora desta última substância.

d) *Ciclo do glicogênio*

Para a verificação do glicogênio no tecido conjuntivo, fixaram-se, durante 24 horas a 0° C fragmentos do manto de *M. perna*, em Gendre, que foi o fixador que deu melhores resultados nestes animais. As secções de 4 a 5 μ previamente embebi-

das em colódio foram coradas segunda a técnica de McManus ao mesmo tempo que outros cortes eram submetidos à ação da saliva por 1/2 hora a 37°C. Desta forma, a reação ao P. A. S. com controle pela digestão salivar permitiu-me apreciar a presença de glicogênio de maneira apenas qualitativa.

O acúmulo do glicogênio no tecido conjuntivo é sincrônico com o reaparecimento dêste em setembro e outubro. A quantidade máxima foi observada em novembro e dezembro.

Em janeiro e em fevereiro, a quantidade de glicogênio diminui no tecido conjuntivo. Pode-se verificar em março, um novo aumento, sincrônico com a retomada do maior desenvolvimento do tecido conjuntivo, fato êste observado principalmente nas fêmeas. Neste período, os animais estão em plena gametogênese e êste novo acúmulo de glucídeos no tecido conjuntivo poderia provir dos metabólitos liberados pela lise dos oócitos.

Em seguida, o glicogênio decresce intensamente durante a restauração das gônadas no período que precede à importante emissão de abril e começo de maio, e desaparece completamente, para reaparecer somente no tecido conjuntivo de neo-formação em agosto e prossegue aumentando em setembro à medida que a intensidade da gametogênese diminui.

Segundo Renzoni (1960, p. 13) em *M. galloprovincialis* é sempre muito escasso o glicogênio no interior dos folículos e nos oócitos, em qualquer estado de desenvolvimento, nunca se observa glicogênio.

Em *M. perna* também não foi encontrado glicogênio no interior dos folículos, porém, nos oócitos, após vitelogênese, são detectados grânulos de glicogênio no interior dos mesmos.

e) *Ciclo dos Lípideos*

Do mesmo modo que para o glicogênio, os lípideos também se acham intimamente relacionados com o ciclo sexual das Mytilidae.

O aparecimento dos lípideos no tecido conjuntivo de neo-formação segue ao do glicogênio, mas não é sincrônica. Confeito, quando se observa um bom desenvolvimento do glicogê-

nio nos meses de agosto e setembro, os lípideos não se desenvolvem em grande quantidade a não ser em outubro. A partir dêste momento estabelece-se o equilíbrio dos dois constituintes.

Enquanto está ocorrendo a gametogênese as reservas lipídicas são praticamente ausentes.

Após uma primeira eliminação de gametas, quando o tecido conjuntivo começa a desenvolver-se nos espaços interfoliculares e iniciado o acúmulo de glicogênio, começa o posterior acúmulo de lípideos (Fig. 32 e 33), sob a forma de gotículas bastante esparsas, que aumentam de tamanho e número à medida que o tecido conjuntivo evolue.

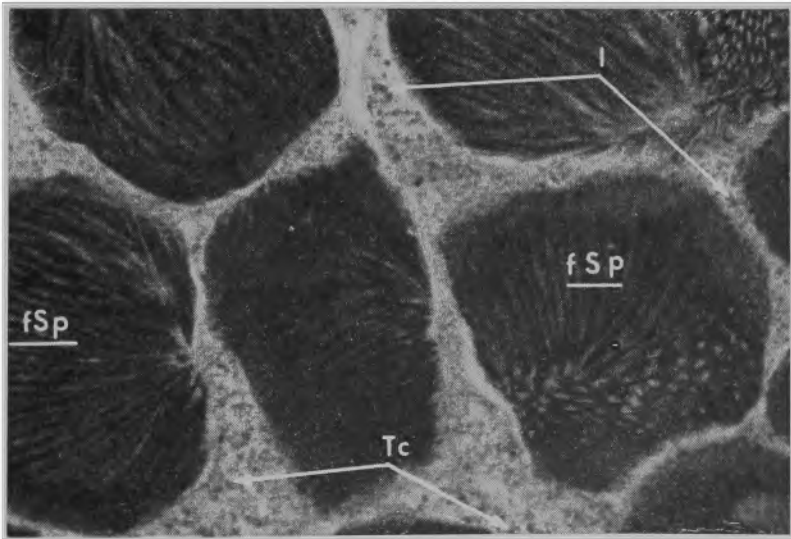


Fig. 32 — Seção do manto de *M. perna* macho, estágio III_{CA1}, tecido conjuntivo estado III, com acúmulo de lípideos neste tecido. fSp: folículo com espermatozóides; l: gotículas de lípideos; Tc: tecido conjuntivo interfolicular. Fixador: formol salino, coloração com vermelho oleoso: Corte a conlação. X135

Os oócitos (Fig. 34), ao contrário, no fim da vitelogênese apresentam-se ricos em reservas lipídicas, as quais conferem à

gônada feminina uma cor particular, como enunciado anteriormente.

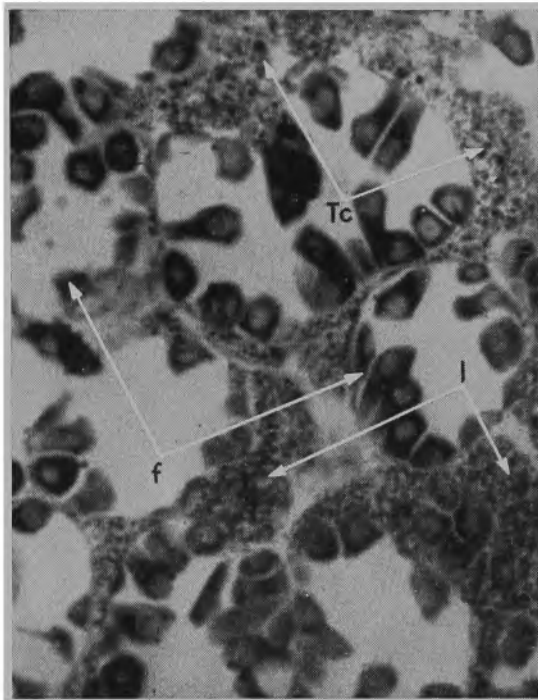


Fig. 33 — Seção do manto de *M. perna* fêmea, estágio III_{CA1}, tecido conjuntivo estado III, com acúmulo inicial de gotículas lipídicas neste tecido. f: folículos com oócitos; l: gotículas de lipídeos no Tc: tecido conjuntivo interfollicular. Fixador formol salino, coloração com vermelho oleoso, corte a congelção. X135

Durante a época de reprodução (estádio III) quando os folículos atingem pleno desenvolvimento, vê-se que o tecido conjuntivo desaparece completamente e, conseqüentemente, são também ausentes as reservas lipídicas. A degradação das substâncias dessas reservas é sincrônica com os fenômenos de gametogênese.

Encontram-se os lípideos em quantidade mais abundante nas células femininas, nas quais constituem com o glicogênio e proteínas, elementos importantes de reservas.

À medida que se processa a gametogênese pode-se verificar que o citoplasma dos oócitos começa enriquecer-se de pequenas gotículas lipídicas.

Paralelamente a êsse fenômeno, o oócito (Fig. 33 e 34) aumenta de diâmetro fazendo saliência na luz de folículo. É a fase de vitelogênese cujo início se caracteriza pelo aparecimento de substâncias de reservas no citoplasma.

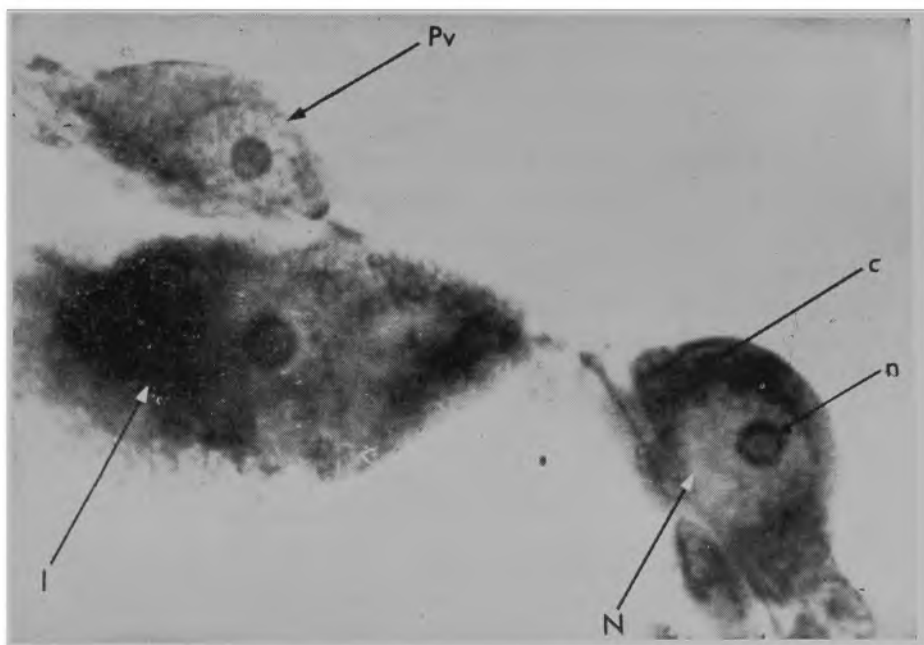


Fig. 34 — Seção do manto de *M. perna* fêmea, mostrando inclusões lipídicas no citoplasma do oócito no fim da vitelogênese. c: citoplasma; N: núcleo; n: nucléolo; l: gotículas lipídicas no interior do oócito. Pv: oócito na previtelogênese. Fixador formol salino, coloração com o Sudan IV; corte a congelação. X870

Durante as fases de previtelogênese, não se encontram lípídeos no interior do citoplasma, sendo nesta fase o mesmo rico em RNA.

Nos machos, durante a espermatogênese, evidenciou-se um enriquecimento importante das espermátides e espermatozóides em fosfolípídeos sob a forma de minúsculas gotas de difícil observação, reveladas somente após a reação de Baker.

Estudando ao microscópio eletrônico o espermatozóide de *M. perna*, Bourcart, Lavallard e Lubet (1965, p. 5099) demonstraram a presença, na peça intermediária, de duas estruturas, uma situada entre a membrana plásmica e a base da corôa mitocondrial, a outra, mais interna mais ou menos colada à membrana plásmica, que forma bruscamente um ângulo para seguir o contorno do flagelo. O acúmulo de fosfolípídeos na peça intermediária de espermatozóides de *M. perna* poderia corresponder verdadeiramente a essas formações vesiculares encontradas por aqueles autores (1.c.). Seria interessante retomar esses trabalhos aduzindo técnicas histoquímicas adequadas, de modo a estudar o conteúdo de tais vesículas, podendo assim, comprovar o fato acima mencionado.

Pode-se observar frequentemente, em torno dos folículos dos machos, uma corôa de células conjuntivas ricas em lípídes que existe mesmo nos estados máximos de repleção das gônadas, quando então o tecido conjuntivo é totalmente ausente. Tal fato não foi verificado nos folículos das fêmeas.

9.

DISCUSSÃO

No que se refere ao ciclo sexual propriamente dito a revisão da bibliografia disponível mostra serem ainda relativamente deficientes as informações precisas sobre as épocas de reprodução. Mesmo em determinadas regiões, principalmente do hemisfério Norte (Nápoles, Toulon, Arcachon, den Helder, Glasgow, Conway, Vigo, California, etc.) em que se fizeram investigações sobre o ciclo de reprodução dos Lamelibrânquios, os dados fornecidos ainda deixam muito a desejar, caracteri-

zando-se êsse ciclo por uma acentuada variação de uma para outra localidade, e também pela falta de uniformidade nas observações. A impressão que se tem é que o ciclo sexual das Mytilidae é fenômeno que varia com a distribuição geográfica dos animais e com as estações do ano, mas nele também interferem outros fatores de importância, que precisam ainda ser devidamente investigados. Dêstes fatores alguns, como o desenvolvimento do tecido conjuntivo, a ocorrência de glucídeos e de lípideos, foram aqui analisados.

Decorre desta situação que ainda não é possível fazer uma comparação entre os diferentes aspectos do ciclo sexual das Mytilidae das regiões tropicais, ou mais propriamente, do *M. perna* com o das regiões do hemisfério Norte. Todavia, com os dados que foram colhidos agora, fiz uma tentativa que poderá servir de base para futuras investigações.

Tanto *M. perna* como *M. edulis* e *M. galloprovincialis* apresentam épocas determinadas em que é relativamente mais acentuada a emissão de gametas, caracterizando assim aspectos particulares dos processos reprodutivos. As duas últimas Mytilidae consideradas, apresentam uma redução intensa desses processos durante os meses de inverno (de dezembro a março) ao passo que *M. perna* mostra um relativo repouso sexual no mês de julho que corresponde, no hemisfério sul, ao inverno do hemisfério norte.

No que se refere à gametogênese repetem-se em *M. perna* aproximadamente os mesmos fenômenos que se observam em *M. edulis* e em *M. galloprovincialis*. De modo particular a espermiogênese apresenta aspectos novos pela análise dos espermatozoides (Franzén 1956, p. 431) com referência especial às mitocôndrias e, mais pormenorizadamente pela análise ao microscópio eletrônico (Boucart et al. 1965). Os aspectos gerais da gametogênese são lembrados por White (1937, p. 87). Apenas se deve notar que na previtelogênese de *M. perna* não ocorre o fracionamento dos nucléolos primitivos tal como acontece em *M. edulis* (Lubet 1959, p. 38). Existe o fracionamento do nucléolo em nucléolos acessórios com esvaziamento do RNA do nucléolo principal. Trabalhando em *M. galloprovincialis* Bo-

lognari (1957, p. 244) lembra a importância do nucléolo na síntese dos elementos que constituem o vitelo.

Na vitelogênese os oócitos de *M. perna* caracterizam-se pela existência de importante quantidade de RNA dentro deles, além da presença de escamas também ricas em RNA na fase terminal do crescimento. Estas estruturas foram descritas por Lubet (1964, p. 39) em *M. galloprovincialis* que se apresentam principalmente após decerebração.

Diferenças entre *M. perna* e *M. galloprovincialis* vêm a ser o desaparecimento, nos primeiros, dos mucopolisacarídeos no fim da vitelogênese.

É interessante assinalar que a característica cor salmão ou amarelo-alaranjado dos oócitos de *M. perna* se deve às inclusões lipídicas.

O problema da lise oocitária foi devidamente considerado; Lubet (1959, p. 60) atribuiu-o ao frio. O *M. perna*, embora vivendo nas regiões tropicais, onde o frio não é intenso, apresenta o mesmo fenômeno. A vacuolização do citoplasma dos oócitos em *M. perna* constitui indício seguro deste fenômeno. Fui levado a dar ao mesmo o significado de elemento que contribui para a nutrição dos oócitos, num certo período, pela exaustão das reservas do tecido conjuntivo, o que encontra apoio no fato da existência de uma estreita relação entre as reservas de lípídeos e de glúteos e a lise oocitária, durante o desenvolvimento dos oócitos. Esta relação é bem visível quando se faz a análise percentual em que o fenômeno ocorre durante os meses em que a oogênese se acentua e as reservas também aumentam (p. 22).

Além disso, ao estudar os granulócitos em relação com as reservas nutritivas pude lembrar sua possível função no ciclo sexual pela fagocitose dos detritos.

Na pesquisa do ciclo sexual e suas modalidades, adotei a classificação de Chipperfield (1953, p. 451) relacionando observações macroscópicas e microscópicas. Os estádios O, I, II em *M. perna* não diferem das demais Mytilidae consideradas, mas o estádio III apresenta aspectos tão interessantes que fui levado a adotar a nomenclatura proposta por Lubet

(1959, p. 82) na qual há subdivisão em vários sub-estádios de III_A a III_C e mesmo para o exame microscópico do manto ainda foi necessário estabelecer uma segunda subdivisão indicando estádios III_A₁ a III_{CA}₁, apresentando suas características em ambos os sexos com relação entre o desenvolvimento dos gametas e o do tecido conjuntivo.

Não encontrei entre os diferentes autores consultados exceto Lubet referências a estas particularidades que, a meu vêr, bem evidenciam modalidades importantes do ciclo sexual em *M. perna*.

Com o exame macroscópico e microscópico do manto, feito em cada mês do ano, durante os anos de 1963 e 1964, foi possível estabelecer a seqüência dos principais fenômenos do ciclo sexual segundo os diferentes estádios. Pela análise dos dados assim obtidos, verifica-se haver tanto nos machos como nas fêmeas, a ocorrência de importantes períodos de expulsão de gametas, que indicam o ápice dos períodos de maturação sexual. Um destes períodos abrange os meses de abril, maio e início de junho e o outro, dá-se em setembro. Nos outros meses, importa lembrar que há também expulsão de gametas, mas não tão acentuadamente, sendo praticamente nula no relativo período de repouso sexual, que ocorre em julho e em dezembro.

Neste particular, é interessante a diferença entre *M. perna*, *M. edulis* e *M. galloprovincialis*, pois nestes dois últimos são bem evidentes os períodos de repouso sexual.

Ao comparar a duração do ciclo sexual nas quatro Mytilidae aqui mencionadas, verifica-se uma acentuada influência da distribuição geográfica, principalmente em *M. edulis*, e a temperatura. Renzoni (1961, p. 58) verificou que em *M. galloprovincialis* o período de reprodução coincide com o fim do inverno e toda a primavera. Não há dúvida que as estações do ano devem influir neste ciclo, como aliás é evidenciado por Young (1942, p. 491). Este autor, porém (1945, p. 63) nega a influência da temperatura sobre o ciclo sexual. Mesmo no hemisfério norte não há uniformidade nos fenômenos reprodutivos. Como a temperatura é relativamente elevada durante todo o ano, sendo indeterminados os limites entre as esta-

ções, talvez *M. perna* encontre aí a causa da falta de repouso sexual absoluto. De novembro a março nota-se diminuição na expulsão de gametas, e o máximo dessa expulsão se dá com a temperatura média de 22,5°C em setembro. Assim, a ausência de importantes variações térmicas talvez possa explicar a continuidade relativa dos fenômenos da reprodução em *M. perna*. Deve-se lembrar ainda que não poucos autores, entre os quais Renzoni (1962, p. 46) associaram as variações das épocas de maturação sexual com as de maior ou menor abundância de alimento. Não me foi possível ainda tratar deste ponto que se me afigura de importância.

No que se refere ao tecido conjuntivo interfolicular os resultados de minhas investigações mostram uma estreita relação do desenvolvimento desse tecido com os fenômenos sexuais. As curvas apresentadas nas Figs. 35 e 36, são bem demonstrativas, e a escala dos estádios que propus indica, ao meu vêr, com bastante precisão essas relações. Como foi mencionado, essa interessante progressão do tecido conjuntivo acha-se intimamente ligada à ocorrência das reservas glúcídicas e lipídicas. Viu-se que se dá uma inversão nos fenômenos, aumentando as reservas no período de relativo repouso sexual, e diminuindo nos de plena repleção dos folículos pelos gametas. Agora que se demonstrou bem claramente essa relação, poder-se-á então proceder ao indispensável estudo quantitativo, cujos resultados, sem dúvida deverão ser bastante interessantes.

Como se viu, admite-se que o tecido conjuntivo tenha origem nas células sanguíneas, os amebócitos, que em *M. perna* se apresentam repletos de grânulos e podem ser classificados entre os granulócitos. Segundo Zacks (1955, p. 64) em *Venus mercenaria* os grânulos dos amebócitos seriam mitocôndrias atípicas.

Não é somente no tecido conjuntivo e nos gametas que ocorre o glicogênio, pois em vários Lamelibrânquios, como *Anodonta* e *Mytilus*, Beedham (1958, p. 194) também verificou ser o mesmo abundante nas células epiteliais do manto, tal como também verifiquei no de *M. perna*.

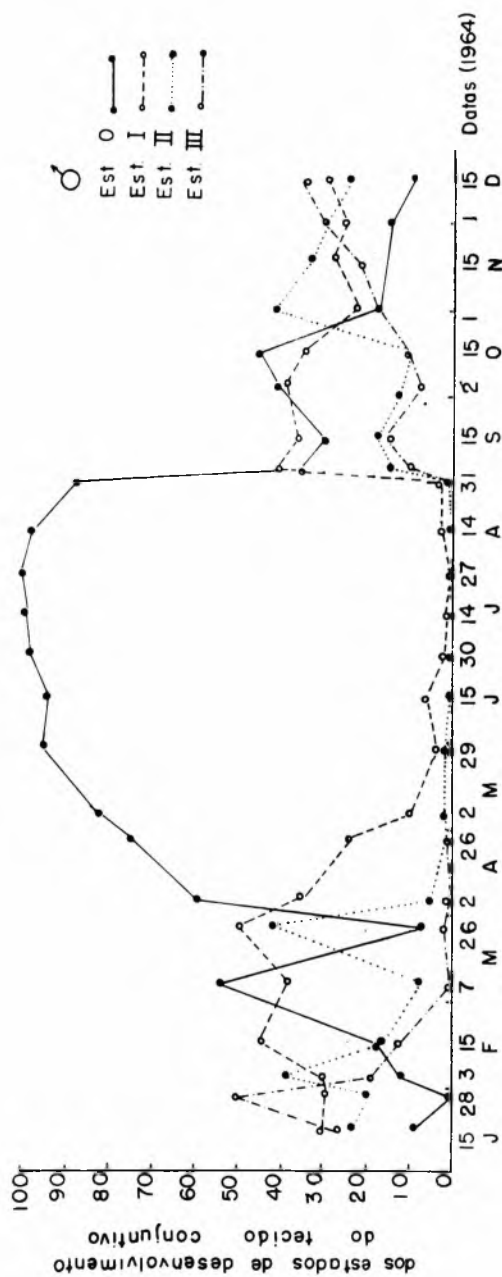
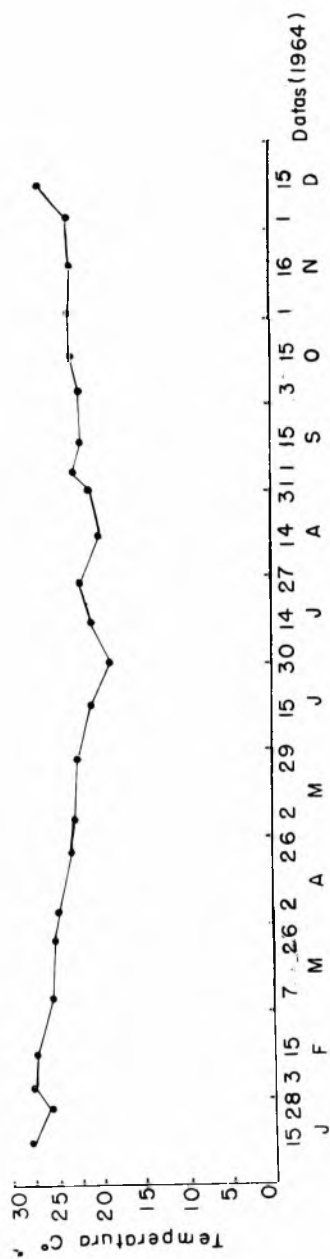


Fig. 36 — Gráfico mostrando as percentagens de desenvolvimento do tecido conjuntivo de *Mytilus* machos.

O exame das células vesiculosas do tecido conjuntivo possibilitou diferenciar as três espécies de *Mytilus*. Enquanto em *M. edulis* e em *M. galloprovincialis* os lípideos e o glicogênio se acumulam em determinadas células havendo porém as células de Leydig que somente concentram glicogênio, em *M. perna* estas últimas não ocorrem.

No que se refere à origem, não resta dúvida que o mesmo provem dos leucócitos, tal como foi também verificado por Gresson (1937, p. 675) em *Modiolus modiolus*.

Para o estudo dêsse tecido foi necessário introduzir uma nova nomenclatura que indicasse melhor os estádios do seu desenvolvimento, a qual vem mencionada à p. 56, e com ela elaborei a Tabela III em que relaciono percentualmente os diferentes estádios e pela qual se pode notar que o tecido conjuntivo apresenta um ciclo que é exatamente o inverso do ciclo sexual. O surto de crescimento dêsse tecido verificado em março, é relacionado com o fenômeno da lise oocitária.

Existe estreita relação entre o desenvolvimento do tecido conjuntivo e as reservas glucídicas e lipídicas, o que vem confirmar os resultados das pesquisas de Lubet (1959) e Renzoni (1961).

Finalmente, foi possível estabelecer correlação entre êsse tecido e o glicogênio e os lípideos. O acúmulo do glicogênio é sincrônico com o reaparecimento do tecido conjuntivo em setembro e outubro, atingindo o máximo de concentração dentro das células em dezembro.

A concentração e a diminuição dos lípideos acompanham as do glicogênio, porém, sem o referido sincronismo. O acúmulo de lípideos dá-se após a primeira eliminação dos gametas. Êste acúmulo é mais acentuado nas células femininas.

10.

CONCLUSÕES

1. A gametogênese de *M. perna* apresenta os mesmos fenômenos conhecidos em geral nas Mytilidae. Apenas na

- previtelogênese não ocorre o fracionamento dos nucléolos como acontece em *M. edulis*.
2. Mesmo sem decerebração, é apreciável a quantidade de RNA em *M. perna* durante a vitelogênese.
 3. Em *M. perna* durante esta fase de reprodução, ocorre o desaparecimento dos mucopolissacárideos, o que não acontece em outras Mytilidae (*M. galloprovincialis*).
 4. O fenômeno da lise oocitária é bastante evidente em *M. perna*.
 5. Neste Bivalvo existe estreita relação entre os elementos sanguíneos (granulócitos) e o ciclo sexual.
 6. Os períodos de maturação sexual ocorrem em *M. perna* em abril, maio ou início de junho e também em setembro.
 7. Em *M. perna* não cessa durante o ano a emissão de gametas, mas existe acentuada diminuição desse fenômeno em julho e em dezembro.
 8. É demonstrada a existência de uma estreita relação entre o desenvolvimento do tecido conjuntivo interfolicular e o ciclo sexual.
 9. Neste fenômeno se acham relacionadas também as reservas em glúcideos e em lípideos.
 10. É proposta uma nova nomenclatura para designar as diferentes fases do crescimento e diminuição do tecido conjuntivo.

BIBLIOGRAFIA

- BARGETON, M. — 1941 — Note sur les "Cellules vésiculeuses a Glicogène". Étude de la distribution du glicogène chez les Lombriciens et chez les Ostreïdes. Bull. Mus. Nat. Hist. Nat., 2.^a S. 13:119-125. Paris.
- BEEDHAM, G. E. — 1958 — Observations on the Mantle of the Lamellibranchia. Quart. Journ. microsc. Sc. 99(2):181-197, 2 t. London.
- BOLOGNARI, A. — 1957 — Ricerche sugli ovociti in accrescimento di *Mytilus galloprovincialis* Lamk. (Mol. Lam. Fil.). Arch. Zool. Ital. 42:229-248.
- BOURCART, C. & LUBET, P. — 1964 — Métabolisme des lipides au cours du cycle sexuel chez *Mytilus galloprovincialis* (Mollusque, Lamellibranche). C.E. Soc. Biol. Paris, 1958(8-9):1638.
- BOURCART, C., LAVALLARD, R. J., & LUBET, P. — 1965 — Ultrastructure du spermatozoïde de la Moule (*Mytilus perna* von Ilhering). C.R. Acad. Soc. Paris 260:5096-5099.
- BOUXIN, H. — 1954 — Observations sur le frai de *Mytilus edulis* var. *galloprovincialis* Lamk. Dates précises du frai. Facteurs provoquant l'émission des produits génitaux. Cons. int. Explor. Mer. Copenhague, Shelfish. Comm. n. 36.
- CHIPPERFIELD, P. N. J. — 1953 — Observation on the Breeding and Settlement of *Mytilus edulis* (L.) in British Waters. J. Mar. biol. Ass. U.K. 32:449-476.
- COE, W. R. & FOX, D. — 1942 — Biology of the California Sea Mussel, *M. californianus*. J. exp. Zool. 90(1):1-30.
- CUÉNOT, L. — 1891 — Études sur le sang et les glandes lymphatiques dans la série animale. 2.^a partie-Invertébrés. Arch. Zool. exp. et générale, 2.s. 9:13-90, Paris
- DE JORGE, F. B. — 1961 — Contribuição ao estudo da composição química dos alimentos de consumo habitual no Estado de São Paulo: Iodo, Potássio, Calcio, Magnésio, Fósforo. Tese Dout. Fac. Med. Univ. S. Paulo, 141 pp. São Paulo.
- DO, F. & LUBET, P. — 1964 — Numération des cellules sanguines chez *Mytilus galloprovincialis* (Mollusque Lamellibranche) C.R. Soc. Biol. Paris 1958:2104.
- FISCHER-PIETTE, E. — 1955 — Répartition le long des côtes d'Espagne des principales espèces peuplant les rochers intercotidaux. Ann. Inst. océanogr. Monaco 31 (2):1-124.

- FRANZEN, A. — 1956 — Comparative morhological investigations in to the spermiogenesis among molluscs. Zool. Bidrag. **30**:399-456, 2 t. Uppsala.
- GALTISOFF, P.S. — 1964 — The American Oyster. *Crassostrea virginica*. Fish. Bull. Wildlife Service, **64**:480 pp. Washington.
- GONSE, H.P. — 1956 — L'ovogenèse chez *Phascolosoma vulgare*. II Recherches biométriques sur les ovocytes. Acta Zool. **37**:225-233.
- GATENBY, J.B. & HIEL, J.C. — 1934 — Improved technique for nona septic Tissue Culture of *Helix adspersa*, with notes on molluscan Cytology. Quart. Journ. micr. Sc., N.S. **76**:331-352, t. 19-22, London.
- GRESSION, A.R. — 1937 — Studies on the Cultivation of Pieces of the Mantle of *Modiolus modiolus*. Quart. Journ micr. Sc. **79**, pt. 4:659-678, London.
- HANDOCK D.A. — 1965 — Adductor Muscle size in Danish and British Mussels and its relations to starfish predation. Ophelia **2**, n.º 2, 254-267.
- KLAPPENBACH, M.A. — 1965 — Lista preliminar de los Mytilidae Brasileños con Claves para su Determinación y Notas sobre su distribución. An. Acad. Bras. Ciên. v. 37, supl. 327-352.
- LOOSANOFF, V.L. — 1937 — Development of the Primary gonad and sexual phases in *Venus mercenaria* Linnaeus Biol. Bull. Wood's Hole, **72**(3):389-406.
- LISON, L. — 1960 — Histochmie et cytochimie animales. Principes et méthodes 2:398-842. Masson & Cie. Paris.
- LUBET, P. — 1959 — Recherches sur le cycle de l'émission des gamètes chez les Mytilidés et les Pectinidés. Thèse Paris, 162 pp. Paris.
- MALTZ, A. & FAERMAN, S. — 1958 — Moluscos comestiveis do Brasil. Berbigões e mexilhões comuns do litoral paulista. An. Farm. Quim. S. Paulo **9**:45-49, São Paulo.
- MEENACKSHI, V.R. — 1956 — Seasonal variations in the glycogen and Fat content in the apple snail, *Pila virens* (Lamarck). Journ. Zool. Soc. India, **8**(1):57-62. Nova Delhi.
- NIJIMA, L. — 1963 — Acrosome reaction and sperm entry in *Mytilus edulis*. Bull. Mar. Biol. St. Asamushi, **11**(4):217-221, Aomori-Japão.
- PÉREZ, C. e KOSTITZINE, J. — 1930 — Processus de résorption dans l'ovaire de la Turritele. C.R. Seanc. Soc. Biol., **104**, pp. 1270-1272.
- QUAYLE, D.B. — 1943 — Sex, Gonad Development and Seasonal Gonad Changes in *Paphia staminea* Conrad. J. Fish. Res. Bd **6**(2):140-151. Toronto.
- RENZONI, A. — 1961 — Variazioni istologiche satagionali delle gonadi di *Mytilus galloprovincialis* Lamk. in rapporto al ciclo riproduttivo. Riv. Biol. **54**(1):45-58, N.S. (14), Bologna.

- 1962 — Ulteriori dati sul ciclo biologico riproduttivo di *Mytilus galloprovincialis* Lamk. Ibid. 55 (1/2), N.S. 15:37-47, Bologna.
- TAKATSUKI, S. — 1934 — On the nature and function of the Amoebocytes of *Ostrea edulis*. Quart. Journ. microsc. Sc., N.S. 76:379-431. London.
- TOBIAS e SILVA, M.M. — 1955a — Contribuição para o estudo do valor nutritivo do sururú alagoano, *Mytilus mundahuensis* Duarte. An. Farm. Quim. S. Paulo, 7(2):20-97, São Paulo.
- 1955b — Cálcio e fósforo totais no sururú alagoano *Mytilus mundahuensis* Duarte. Ibid.,: 98-102, São Paulo.
- TRANter D.J. — 1958 — Reproduction in Australian Pearl Oysters *Lamellibranchia*) — Australian Journ. Mar. Fresh Water Research, 9(1) 144-158, 5T.
- VASSEUR, E. — 1952 — The chemistry and Physiology of the jelly coat of the Sea Urchin egg. The Wenner Gren Inst. exp. Biol. Univ. Stockholm, 32 pp. Sotckholm.
- VENDRELY-RANDAVEL, C. — 1949 — L'acide chloridrique, succédané de la ribonucléase dans la localisation de l'acide ribonucléique chez les cellules des êtres supérieurs aussi bien que chez les bactéries. Aspect histologique de la question. C.R. Acad. Sc. Paris, 228:608-610. Paris.
- WHITE, K.M. — 1937 — *Mytilus*, L.M.B. Memoirs ed. R.J. Daniel, 117 pp., 10 t. Liverpool.
- YOUNG, R.T. — 1942 — Spawning Season of the California Mussel, *Mytilus californianus*. Ecology 23(4):490-492, Brooklyn, N.Y.
- 1945 — Stimulation of Spawning, in the Mussel (*Mytilus californianus*). Ecology 26(1):58-69, Brooklyn.
- ZACKS, S.J. — 1955 — The cytochemistry of the Amoebocytes and Intestinal Epithelium of *Venus mercenaria* (Lamellibranchiata) with Remarks on a Pigment resembling Ceroid. Quart. Journ. micr. Sc., 96, pt. 1:57-71, 2 t. London.

